

ОКИСЬ АЗОТА И ЛЕГКИЕ

Н.А. Вознесенский, А.Г. Чучалин, Н.С. Антонов

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

Введение

Оксид азота (NO) — газ, обнаруживаемый в атмосфере в концентрации от 1 до 600 ppb¹ [1]. Исследования последних лет выяснили, что оксид азота — один из важнейших биологических медиаторов в организме животных и человека. Хотя эмпирически доноры оксида азота используются в медицине более века (W. Murrell использовал нитроглицерин для лечения стенокардии в 1879 г.) [2], только в последние 10—15 лет стали более ясны механизмы участия оксида азота во многих физиологических и патофизиологических процессах в большинстве систем организма: сердечно-сосудистой (регуляция тонуса и структуры сосудов, антитромботическое действие), дыхательной (бронхорасширяющее действие), нервной (участие в регуляции гладких мышц сосудов, бронхов, пищеварительной и мочеполовой систем; возможный медиатор функции памяти и болевой рецепции), иммунной (регуляция воспаления и иммунной защиты) [5].

Новейшая история исследования NO в медицине начинается с 1980 г., когда Furchgott и Zawadzki открыли, что для расслабления стенки аорты в ответ на ацетилхолин необходимо присутствие интактного эндотелия, который продуцирует эндотелиальный расслабляющий фактор (EDRF, *endothelium-derived relaxing factor*) [3]. Впоследствии были получены доказательства, что EDRF — не что иное, как оксид азота (Palmer, Ignarro, Moncada, 1987) [4]. Оксид азота образуется из аминокислоты L-аргинина при воздействии различных изоформ NO-синтаз (NOS) (Moncada и соавт., 1989; Nathan, 1992) [4] — ферментов, обнаруженных во многих клетках организма: эндотелии, нейронах, миоцитах сосудов, скелетных мышцах, миокарда; тромбоцитах, фибробластах, иммунных клетках, нейтрофилах, тучных клетках, гепатоцитах [5]. Идентифицировано 3 изоформы NO-синтаз, каждая из которых кодируется собственным геном (Nathan, Xie, 1994) [6]. В легких оксид азота образуется в клетках

эндотелия артерий и вен, нейронах неадренергической нехолинергической ингибирующей нервной системы (НАНХ), эпителиоцитах, макрофагах, нейтрофилах и др. [3].

В 1991 г. Gustafsson и др. обнаружили оксид азота в выдыхаемом воздухе у животных и здоровых людей [7]. В дальнейшем Alving, Kharitonov, Persson с помощью хемиллюминесцентного анализатора выявили повышенные уровни NO в выдыхаемом воздухе у больных с бронхиальной астмой [8,9] и с бронхоэктазами [10]. Было доказано, что источником оксида азота у этих больных являются нижние отделы респираторного тракта [9], причем уровень NO снижается при лечении глюкокортикоидами [11]. Таким образом, неинвазивный метод определения оксида азота в выдыхаемом воздухе можно использовать для диагностики и мониторинга активности воспалительных респираторных заболеваний [1].

Следующее направление исследований — применение оксида азота в качестве терапевтического агента. От других вазодилататоров, используемых при легочной гипертензии, оксид азота выгодно отличается способностью при ингаляционном введении (концентрация от 10 до 80 ppm²) расширять только сосуды легких без системной вазодилатации (благодаря быстрому связыванию с гемоглобином: время полужизни 2—6 с) [12] и увеличивать оксигенацию крови за счет улучшения перфузионно-вентиляционных отношений (избирательное расширение сосудов вентилируемых областей) [3]. Начиная с 90-х гг. Zapol и др.; Frostell и др.; Pepke-Zaba и др.; Roberts и др.; Adnot и др. начали применять ингаляционно NO в лечении первичной легочной гипертензии, респираторного дистресс-синдрома взрослых, персистирующей легочной гипертензии новорожденных, хронической обструктивной болезни легких, в сердечно-сосудистой хирургии и при трансплантации легких и сердца [2,3,6]. Кроме этого, ингаляция оксида азота используется для

¹ ppb — частиц на миллиард.

² ppm — частиц на миллион.

Характеристика изоформ NO-синтаз [5]

	тип 1 (nNOS) конститутивный	тип 2 (eNOS) конститутивный	тип 3 (iNOS) индуцибельный
Кодирующая хромосома	12	7	17
Локализация в клетке	Цитоплазма	Связаны с мембраной	Цитоплазма
Типы клеток	Нейроны, миоциты скелетной мускулатуры	Эндотелий, тромбоциты, эндокард, миокард	Миоциты сосудов, эндотелий, эндо/миокард, гепатоциты, астроциты, фибробласты, макрофаги
Активация	Кальцийзависимая	Кальцийзависимая	Не зависит от кальция
Ответ на стимуляцию (пример)	Конститутивный фермент (взаимодействие глутамата с рецептором нейрона ведет к немедленному выделению NO дендритами)	Конститутивный фермент (взаимодействие ацетилхолина с рецептором сосудистого эндотелия ведет к немедленному выделению NO)	Индукция синтеза фермента (липополисахариды и цитокины приводят к отсроченному на 2—6 часов выделению большого количества NO)
Неселективные ингибиторы	Аналоги L-аргинина (L-NAME, L-NMMA)	Аналоги L-аргинина (L-NAME, L-NMMA)	Аналоги L-аргинина (L-NAME, L-NMMA)
Селективные ингибиторы. Регуляция			Аминогуанидин, кортикостероиды и ингибиторы белкового синтеза предотвращают индукцию фермента.

оценки вклада в повышенное легочное сосудистое сопротивление вазоспастического (обратимого) компонента [2].

Биохимия и физиология оксида азота

Оксид азота (NO) — летучий газ, один из оксидов азота. Благодаря непарному электрону на одной из молекулярных орбит молекула NO обладает свойствами свободного радикала. Оксид азота термодинамически нестабилен, однако трансформация NO в N₂O и NO₂ происходит только при значительном повышении давления (около 200 атмосфер при 30°C). При комнатной температуре и атмосферном давлении оксид азота достаточно устойчив, не разрушается на свету [12].

В организме оксид азота образуется из аминокислоты L-аргинина под действием стереоспецифических ферментов NO-синтаз (NOS) [15]. NO-синтазы — гемопротейны, катализирующие окислительно-восстановительную реакцию с участием кислорода и ряда кофакторов (НАДФН, тетрагидробиоптерин) [5]. В настоящее время описано 3 типа (изоформы) NO-синтаз, молекулы их клонированы и определены аминокислотные последовательности [4,13]. Функционально выделяют конститутивные и индуцибельные NO-синтазы. Две изоформы NOS — конститутивные: эндотелиальная NOS (eNOS или тип 3) и нейрональная NOS (nNOS или тип 1), и одна — индуцибельная (iNOS, тип 2) [3,14]. Изоформы NO-синтаз отличаются друг от друга кодирующим геном, распределением в клетках, способом регуляции, скоростью ответа на стимул (табл.1) [5].

Конститутивные изоформы NOS (cNOS) постоянно экспрессированы в эндотелиоцитах, нейронах и других клетках. Активируясь при увеличении concentra-

ции внутриклеточного кальция в ответ на стимуляцию рецепторов одним из медиаторов (ацетилхолин, брадикинин, гистамин), конститутивные NOS быстро (в течение секунд или минут) синтезируют небольшие количества (пикомоли) NO [5,14], участвуя таким образом в передаче физиологического сигнала [3].

Индукцибельная NO-синтаза обнаружена в цитоплазме иммунных, эпителиальных, гладкомышечных и других клеток, не зависит от кальция. iNOS вновь синтезируется клеткой в течение нескольких часов (начиная с транскрипции гена) в ответ на действие цитокинов (интерферона- γ , фактора некроза опухолей — TNF- α , интерлейкина-1 β), эндо- или экзотоксина [5]. После экспрессии iNOS образует в 1000 раз большие, чем cNOS, количества оксида азота (наномоли). Одно из возможных физиологических назначений этого процесса — токсическое действие образовавшейся оксида азота на микроорганизмы и опухолевые клетки [3].

В исследованиях, посвященных оксиду азота, важнейшую роль играют неселективные ингибиторы NO-синтазы — структурные аналоги L-аргинина, конкурентно блокирующие продукцию оксида азота всеми типами NO-синтаз: L-NG-монометил-аргинин (L-NMMA) и L-NG-аргинин-метил-эфир (L-NAME) [12]. Аминогуанидин селективно ингибирует индуцибельную NO-синтазу, а глюкокортикоиды предотвращают ее индукцию [5].

Оксид азота, образовавшись, выполняет свои физиологические функции и подвергается метаболизму одним из трех основных способов, причем время полужизни составляет несколько секунд [5].

Основной путь метаболизма — реакция с гемопротейнами. Во-первых, многообразные клеточные эффекты NO (расслабление гладких миоцитов и т.д.) запускаются при связывании оксида азота с гемосдер-

жащим ферментом гуанилатциклазой. Во-вторых, NO быстро реагирует с гемоглобином эритроцитов, образуя метгемоглобин и анионы NO_2^- и NO_3^- [12].

Второй путь метаболизма NO, объясняющий цитотоксичность окиси азота, — реакция с супероксид-анионом (O_2^-), через пероксинитрит (OONO^-) приводящая к образованию гидроксил-радикала (OH^\cdot). Оба этих вещества — оксиданты, высокоактивные в отношении липидов, белков и нуклеиновых кислот [12,5].

Третий путь метаболизма — образование нитрозотиилов в быстрой обратимой реакции $\text{NO} + \text{RSH} \rightarrow \text{RSNO}$. Возможно, нитрозотиилы, присутствующие в плазме человека, — стабилизированная форма окиси азота в биологических тканях [12]. Образование NO_2 из NO в физиологических условиях не происходит.

В респираторном тракте представлены все три типа NO-синтаз [5]. Окись азота продуцируют конститутивные NOS эндотелия легочных сосудов, нейронов неадренергической нехолинергической ингибирующей нервной системы (НАНХ), эпителиальных клеток [3], а также индуцибельные NOS эпителиа дыхательных путей [13], воспалительных и иммунокомпетентных клеток (макрофагов, нейтрофилов, тучных клеток), эндотелия, миоцитов [3]. Окись азота участвует в таких процессах, как регуляция тонуса и структуры легочных сосудов (NO — медиатор, через который эндотелий передает миоцитам команду о расширении сосудов при действии ацетилхолина, гистамина), бронходилатация (у человека выражена слабо, преимущественно в крупных бронхах), цилиарный транспорт, воспаление и иммунная защита [5].

Измерение окиси азота в выдыхаемом воздухе

Окись азота может быть обнаружена в выдыхаемом воздухе у человека и животных в концентрации от 1 до нескольких сотен ppb. Методики измерения могут быть разными, но большинство приборов основано на принципе хемилюминесценции: в результате реакции NO с озоном, генерируемым анализатором, образуется молекула диоксида азота (NO_2) с высокоэнергети-

ческим электроном, впоследствии испускающая фотон, регистрируемый датчиком. Принципиальная схема хемилюминесцентного анализатора представлена на рис.1. Современные анализаторы позволяют проводить измерения окиси азота в выдыхаемом воздухе в режиме реального времени с точностью до десятых долей ppb в пределах от 1 ppb до десятков ppm (рис.2).

Первоначально измерения NO проводили в воздухе, собранном за несколько выдохов в резервуар, но затем было обнаружено, что концентрация NO неодинакова в различных отделах респираторного тракта: в полости носа, околоносовых пазухах и носоглотке содержание NO значительно выше, чем в нижних дыхательных путях. Так, нормальная концентрация NO в бронхах, определенная при бронхоскопии или через трахеостому, составляет около 7 ± 4 ppb, а концентрация NO в полости носа и носоглотке достигает 1000 ppb. Таким образом, необходимо разделять уровень NO на разных уровнях респираторного тракта, избегая ложного завышения уровней NO в нижних дыхательных путях из-за контаминации воздухом из полости носа и носоглотки. Это достигается либо окклюзией носоглотки с помощью специальных приспособлений, либо при выдохе с сопротивлением, когда мягкое небо закрывает вход в носоглотку.

В связи с тем, что в разных исследованиях нередко использовались различные методики измерения и дыхательные маневры, возникла потребность в стандартизации подходов к измерениям. Такой консенсус был принят группой ведущих исследователей в сентябре 1996: "*Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations*" — рекомендации по измерению выдыхаемой и назальной окиси азота [1]. В этом документе изложены требования к аппаратуре, рекомендации по калибровке, контролю точности и безопасности измерений; методики измерения; технические и физиологические факторы, оказывающие влияние на величину выдыхаемой окиси азота.

Наиболее предпочтительной методикой является выдох через загубник с ограничителем потока, создающим небольшое (5—20 см водного столба) положи-

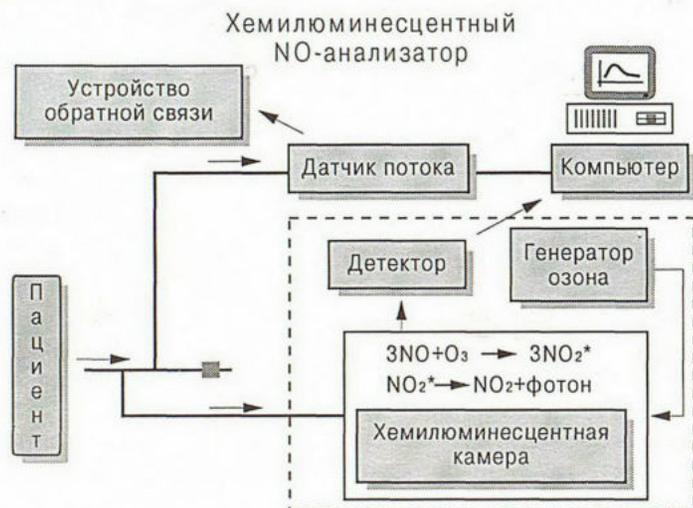


Рис.1. Схема NO-анализатора.

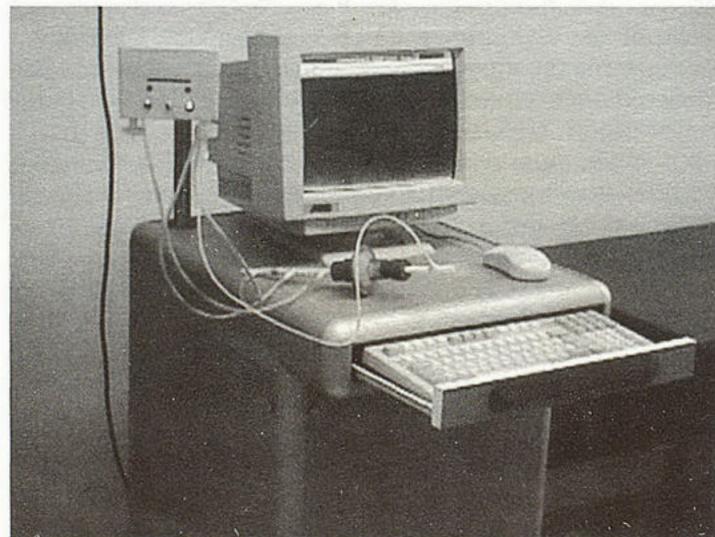


Рис.2. Хемилюминесцентный NO-анализатор Logan Research.

Таблица 2

Факторы, влияющие на выдыхаемую окись азота (NO)

Увеличение NO	Уменьшение NO
Введение L-аргинина	Введение ингибиторов NOS, глюкокортикоидов
Физическая нагрузка	Курение
Задержка дыхания	Прием алкоголя
Фаза менструального цикла	Фаза менструального цикла
Бронхиальная астма	ХОБЛ
Бронхоэктазы	Муковисцидоз
Системная красная волчанка с поражением легких	Системная склеродермия с легочной гипертензией
Вирусная инфекция респираторного тракта	ВИЧ-инфекция
Цирроз печени	
Синдром обструктивного апноэ сна	

тельное давление. Воздух для анализа забирается через T-образно подсоединенную трубку. Пациент находится в покое в положении сидя, после максимального вдоха производит единственный выдох с постоянной скоростью (10—15 л/мин), ориентируясь на показания устройства обратной связи в течение 5—30 секунд. Полученная кривая (рис.3) имеет начальный пик, соответствующий воздуху мертвого пространства. Эта порция воздуха (около 0,5—0,75 л в зависимости от ЖЕЛ) контаминирована назальной и/или атмосферной окисью азота и практического интереса не представляет. Состояние нижних дыхательных путей характеризует фаза плато, следующая за начальным пиком и совпадающая по времени с максимумом углекислого газа при одновременном измерении. Значения NO в фазу плато соответствуют значениям, полученным прямым измерением при бронхоскопии (7 ± 4 ppb). Эта методика применима у взрослых и детей старше 6 лет. У младших детей и тех взрослых, которые не в состоянии поддерживать заданную скорость выдоха, исследование можно проводить при спокойном дыхании, в том числе собирая воздух в резервуар. В этом случае необходимо учитывать параметры дыхания.

На величину выдыхаемой окиси азота влияют ряд факторов (табл.2). Так, во избежание связывания NO дыхательный контур должен быть сделан из инертных материалов (нержавеющая сталь, тефлон), непосредственно перед измерением нельзя использовать дезинфектанты, содержащие этанол.

Имеются противоречивые сообщения о влиянии возраста и пола на величину NO; в одном из исследований найдена зависимость NO от площади поверхности тела. Физическая нагрузка незначительно увеличивает выделение NO. Задержка дыхания приводит к росту пика NO, более выраженному у больных астмой по сравнению со здоровыми. Курение снижает уровень NO, оказывая как хронический, так и острый

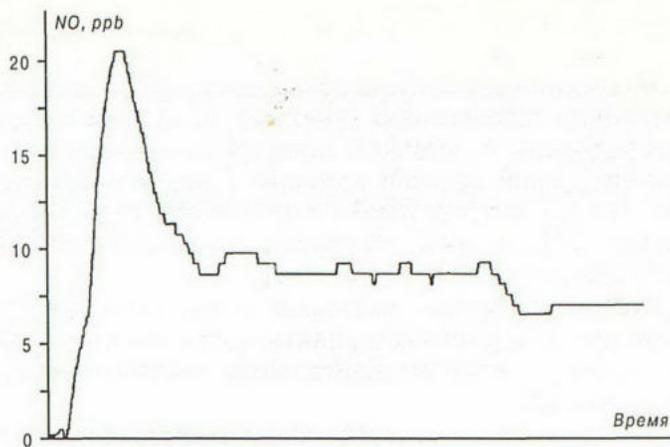


Рис.3. Выдыхаемая окись азота: норма.

эффект; при отказе от курения уровень NO постепенно возвращается к норме. Алкоголь снижает выделение NO, тормозя iNOS. Уровень NO зависит от фазы менструального цикла, достигая наибольших значений в его середине. Увеличение NO может наблюдаться при вирусных инфекциях верхних дыхательных путей. Колебания содержания L-аргинина в обычной диете значимо не влияют на уровень NO [1].

Большой интерес представляют изменения выдыхаемой окиси азота при различных заболеваниях (см. табл.2). Концентрация NO возрастает при воспалительных заболеваниях дыхательных путей: бронхиальной астме [8,9], бронхоэктазах [10], инфекциях респираторного тракта [1].

Изменениям NO при бронхиальной астме посвящено много работ, окись азота признана маркером аллергического воспаления при астме [27]. Известно, что выделение NO увеличивается при обострении астмы, в позднюю фазу ответа на аллерген, когда провоспалительные цитокины вызывают экспрессию индуцибельной NOS. Уровень NO не повышается при бронхоконстрикции, вызванной метахолином или гистамином (прямое действие на миоциты) [18]. Под влиянием противовоспалительной терапии глюкокортикоидами *per os* или ингаляционно происходит снижение уровня NO до нормального (глюкокортикоиды блокируют экспрессию iNOS) [19], при уменьшении дозы ингаляционных глюкокортикоидов уровни NO возрастают, причем динамика NO опережает изменения других функциональных тестов [20]. Обнаружена корреляция между выдыхаемой окисью азота и другими маркерами воспаления (эозинофилами в индуцированной мокроте, эозинофильным катионным протеином), но не степенью бронхиальной гиперреактивности [22,26]. При исследовании динамики окиси азота не удалось получить доказательств противовоспалительного действия бета-агонистов, но отдельные работы позволяют предполагать противовоспалительный эффект у антагонистов лейкотриенов (пранлукаст) [22]. Таким образом, благодаря простоте и неинвазивности метода, исследование окиси азота может использоваться для дифференциальной диагностики, мониторинга воспаления в дыхательных путях, ис-

следований противовоспалительной активности лекарственных препаратов и оптимизации терапии [27].

Изменения окиси азота обнаружены при некоторых системных заболеваниях (уменьшение при системной склеродермии с легочной гипертензией, увеличение при системной красной волчанке с поражением легких) [17,23]; циррозе печени с печеночной недостаточностью [24]; синдроме обструктивного апноэ сна [25], ВИЧ-инфекции [21].

Повышение уровня назальной окиси азота обнаружено при аллергическом рините, тогда как при муковисцидозе и синдроме Картагенера наблюдается его снижение [27].

Окись азота, "биологический медиатор десятилетия", остается, наряду с другими биомаркерами, областью активных исследований на стыке медицины, биологии, биохимии и фармацевтики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kharitonov S.A., Alving K., Barnes P.J. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations // *Eur. Respir. J.*— 1997.— Vol.10.— P.1683—1693.
2. Adatia I., Wessel D.L. Therapeutic use of inhaled nitric oxide // *Curr. Opin. Pediatr.*— 1994.— Vol.6, № 5.— P.583—590.
3. Adnot S., Raffestin B., Eddahibi S. NO in the lung // *Respir.-Physiol.*— 1995.— Vol.101, № 2.— P.109—120.
4. Nijkamp F.P., Folkerts G. Nitric oxide and bronchial hyperresponsiveness // *Arch. Int. Pharmacodyn.*— 1995.— Vol.329, № 1.— P.81—96.
5. Singh S., Evans T.W. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? // *Eur. Respir. J.*— 1997.— Vol.10.— P.699—707.
6. Higenbottam T. Lung disease and pulmonary endothelial nitric oxide // *Exp. Physiol.*— 1995.— Vol.80, № 5.— P.855—864.
7. Kharitonov S.A., Barnes P.J. Exhaled nitric oxide: a marker of airway inflammation? // *Curr. Opin. Anaesthesiol.*— 1996.— Vol.9.— P.542—548.
8. Alving K., Weitzberg E., Lundberg J.M. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics // *Eur. Respir. J.*— 1993.— Vol.6.— P.1368—1370.
9. Kharitonov S.A., Fan Chung K., Evans D.J., O'Connor B.J., Barnes P.J. Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from the lower respiratory tract // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*— 1996.— Vol.153.— P.1773—1780.
10. Kharitonov S.A., Wells A.U., O'Connor B.J., Cole P.J., Hansell D.M., Logan-Sinclair R.B., Barnes P.J. Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis // *Ibid.*— 1995.— Vol.151, № 6.— P.1889—1893.
11. Yates D.H., Kharitonov S.A., Robbins R.A., Thomas P.S., Barnes P.J. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide // *Ibid.*— 1995.— Vol.152, № 3.— P.892—896.
12. Edwards A.D. The pharmacology of inhaled nitric oxide // *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.*— 1995.— Vol.72, № 2.— P.F127—F130.
13. Guo F.H., De-Raeve H.R., Rice T.W., Stuehr D.J., Thunnissen F.B., Erzurum S.C. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1995.— Vol.92, № 17.— P.7809—7813.
14. Nijkamp F.P., Folkerts G. Nitric oxide and bronchial reactivity // *Clin. Exp. Allergy.*— 1994.— Vol.24, № 10.— P.905—914.
15. Belvisi M.G., Ward J.K., Mitchell J.A., Barnes P.J. Nitric oxide as a neurotransmitter in human airways // *Arch. Int. Pharmacodyn.*— 1995.— Vol.329, № 1.— P.97—110.
16. Nardini S. Measurement of exhaled nitric oxide and chest disease // *Monaldi. Arch. Chest. Dis.*— 1994.— Vol.49, № 4.— P.356—357.
17. Loscalzo J. Nitric oxide and vascular disease (editorial; comment) // *N. Engl. J. Med.*— 1995.— Vol.333, № 4.— P.251—253.
18. Kharitonov S.A., O'Connor B.J., Evans D.J., Barnes P.J. Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*— 1995.— Vol.151, № 6.— P.1894—1899.
19. Kharitonov S.A., Yates D.H., Barnes P.J. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients // *Ibid.*— 1996.— Vol.153, № 1.— P.454—457.
20. Kharitonov S.A., Yates D.H., Chung K.F., Barnes P.J. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide level in asthmatic patients // *Eur. Respir. J.*— 1996.— Vol.9.— P.196—201.
21. Loveless M.O., Phillips C.R., Giraud G.D., Holden W.E. Decreased exhaled nitric oxide in subjects with HIV infection // *Thorax.*— 1997.— Vol.52, № 2.— P.185—186.
22. Tamaoki J., Kondo M., Sakai N., Nakata J., Takemura H., Nagai A., Takizawa T., Konno K. Leukotriene antagonist prevents exacerbation of asthma during reduction of high-dose inhaled corticosteroid // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*— 1997.— Vol.155, № 4.— P.1235—1240.
23. Rolla G., Brussino L., Bertero M.T., Colagrande P., Converso M., Bucca C., Polizzi S., Caligaris-Cappio F. Increased nitric oxide in exhaled air of patients with systemic lupus erythematosus // *J. Rheumatol.*— 1997.— Vol.24, № 6.— P.1066—1071.
24. Soumlderma C., Leone A., Furst V., Persson M.G. Endogenous nitric oxide in exhaled air from patients with liver cirrhosis // *Scand. J. Gastroenterol.*— 1997.— Vol.32, № 6.— P.591—597.
25. Olopade C.O., Christon J.A., Zakkar M., Hua C., Swedler W.I., Scheff P.A., Rubinstein I. Exhaled pentane and nitric oxide levels in patients with obstructive sleep apnea // *Chest.*— 1997.— Vol.111, № 6.— P.1500—1504.
26. Satouchi M., Maeda H., Yu Y., Yokoyama M. Clinical significance of the increased peak levels of exhaled nitric oxide in patients with bronchial asthma // *Intern Med.*— 1996.— Vol.35.— № 4, P.270—275.
27. Харитонов С.А., Барнс П.Дж., Чучалин А.Г. Выдыхаемый оксид азота: новый тест в оценке функции легких // *Пульмонология.*— 1997.— № 3.— С.7—13.

Поступила 09.04.98.