

С.К.Соодаева¹, И.А.Климанов¹, Т.В.Ли², О.П.Миронова², А.И.Федин², Л.Б.Постникова³, Н.И.Кубышева⁴

Изменение метаболизма оксида азота при хронической обструктивной болезни легких в сочетании с хронической ишемией головного мозга

1 – ФГУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России: 105077, Москва, ул. 11-Парковая, 32, корп. 4;

2 – РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1;

3 – МЛПУ "Городская больница № 28", Городской консультативный центр для больных ХОБЛ: 603035, Нижний Новгород, ул. Чаадаева, 7;

4 – МЛПУ "Детская городская клиническая больница № 27 "Айболит": 603035, Нижний Новгород, ул. Ярошенко, 7а

S.K.Soodaeva, I.A.Klimanov, T.V.Li, O.P.Mironova, A.I.Fedin, L.B.Postnikova, N.I.Kubysheva

Changes in nitric oxide metabolism in co-morbidity of chronic obstructive pulmonary disease and chronic cerebral ischemia

Summary

The study was aimed at investigation of nitric oxide (NO) metabolism including total and separate concentrations of stable NO metabolites (nitrate anions and nitrite anions) and 3-nitrotyrosine concentration in stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and in COPD with concomitant chronic cerebral ischemia (CCI). The study involved 55 patients aged 51 to 67 years divided into 2 groups: 28 patients with COPD II–III stage (the 1st group) and 27 patients with COPD II–III stage and concomitant CCI II–III stage (the 2nd group). The control group included 25 healthy non-smoking volunteers. A significant increase in nitrate anion concentration and in the total nitrite and nitrate concentration was found in the blood of patients of both groups compared to the controls. A statistically significant inverse relationship was found between the blood nitrite anion concentration and FEV₁ ($r = -0.77$; $p < 0.05$) in COPD patients. These results demonstrate that changes in NO metabolism related to nitrous stress could emerge even in stable COPD. In co-existing COPD and CCI, changes in these biomarkers could be also related to functional particularities of nitrite reductase apart from the nitrous stress.

Key words: nitric oxide metabolism, chronic obstructive pulmonary disease, chronic cerebral ischemia.

Резюме

Целью исследования было изучение метаболизма оксида азота (NO) при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) в стадии ремиссии, а также при ХОБЛ в сочетании с хронической ишемией головного мозга (ХИГМ) с оценкой концентрации стабильных метаболитов оксида азота нитрат- и нитрит-анионов, их суммарной концентрации ($\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$), а также 3-нитротирозина. В исследование были включены 55 пациентов в возрасте от 51 до 67 лет, которые были разделены на 2 группы. 1-ю группу составили 28 больных ХОБЛ II и III стадии, 2-ю группу – 27 больных с ХОБЛ II и III стадии в сочетании с ХИГМ II и III степени тяжести. В контрольную группу вошли 26 практически здоровых некурящих добровольцев. Выявлено достоверное увеличение, в сравнении с контролем, содержания как нитрат-анионов, так и $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ в крови при ХОБЛ и сочетании ХОБЛ и ХИГМ. При исследовании содержания нитрит-анионов зарегистрировано их достоверное повышение только при ХОБЛ в сравнении с группой контроля. Обнаружена статистически значимая отрицательная коррелятивная связь между уровнем нитрит-анионов в крови и величиной объема форсированного выдоха за 1-ю с ($r = -0.77$; $p < 0,05$) у пациентов с ХОБЛ. Полученные данные свидетельствуют о том, что даже в стадии ремиссии при ХОБЛ наблюдаются изменения метаболизма NO, отражающие развитие нитрозивного стресса. При сочетании ХОБЛ с ХИГМ изменения исследованных показателей, помимо нитрозивного стресса, очевидно, связаны с особенностями функционирования нитрит-редуктазных систем.

Ключевые слова: особенности метаболизма оксида азота, хроническая обструктивная болезнь легких, хроническая обструктивная болезнь легких в сочетании с хронической ишемией головного мозга.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) по своей распространенности занимает одно из лидирующих мест в структуре патологии респираторной системы и характеризуется высоким уровнем социального бремени [1]. К наиболее распространенным сопутствующим заболеваниям при ХОБЛ относится хроническая ишемия головного мозга (ХИГМ) – до 40 % [2].

В настоящее время большой интерес представляет изучение роли оксида азота (NO) в патогенезе этих заболеваний и особенно при их сочетании. NO является одним из наиболее важных биологических медиаторов, который вовлечен во множество физио-

логических и патофизиологических процессов. Он представляет собой уникальный по своей природе и механизмам действия вторичный мессенджер в большинстве клеток организма. NO участвует в реализации большинства физиологических функций, таких как вазодилатация, нейротрансмиссия, снижение агрегации тромбоцитов, реакции иммунной системы, регуляция тонуса гладких мышц и т. д. [3–5].

NO – свободный радикал, период жизни которого, по разным данным, составляет от 3 до 30 с. Дальнейшая судьба NO и опосредуемый этой молекулой биологический эффект зависят от взаимодействия с той

или иной химической группой. В каскаде этих реакций образуются стабильные метаболиты оксида азота, такие как нитраты (NO_3^-), нитриты (NO_2^-), S-нитрозотиолы, 3-нитротирозин (рис. 1).

Избыточное накопление NO в результате экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) может оказывать опосредованное констрикторное воздействие через активацию сосудистой проницаемости и вызывать воспалительный отек в результате накопления активных форм кислорода и увеличения продукции провоспалительных простагландинов. Кроме того, высокая концентрация NO может обуславливать констрикцию воздухоносных путей [6, 7].

В некоторых работах было показано, что развитие окислительного стресса при ХОБЛ сочетается с усилением продукции NO в результате активации iNOS [8, 9]. Выявлено, что уровень спонтанной и индуцированной продукции NO_2^- , NO_3^- моноцитами крови в условиях культивирования клеток *in vitro* у больных ХОБЛ в период ремиссии значительно выше по сравнению со здоровыми некурящими лицами. Увеличение содержания стабильных метаболитов NO при ХОБЛ обнаружено и в конденсате выдыхаемого воздуха [10].

К основным этиологическим факторам ХИГМ относят атеросклероз и артериальную гипертензию, при которых обнаруживается нарушение механизмов регуляции с участием NO [11]. Показано, что усиленное образование NO при ишемии мозга обусловлено активацией нейрональной и индуцибельной NOS, тогда как активность эндотелиальной NOS в сосудах мозга падает. Однако данные об изменениях содержания NO в церебральных структурах во время ишемии достаточно противоречивы. Имеются сведения о возрастании, уменьшении и фазности изменений количества NO, образовавшегося в ишемизированном мозге [12].

Негативное влияние NO при ХИГМ в основном связывают с тем, что в комбинации с супероксидными радикалами он образует высокотоксичный пероксинитрит, способствующий повреждению липидов, белков, ДНК, клеточных мембран и клеток в целом и ведущий к нейродегенеративным повреждениям [12–14]. В то же время цикл метаболизма NO как при ХОБЛ в стадии ремиссии, так и при сочетании ХОБЛ с ХИГМ остается невыясненным.

Целью настоящей работы явилось изучение метаболизма NO при ХОБЛ, а также при ХОБЛ в сочета-

нии с ХИГМ с оценкой концентрации стабильных метаболитов оксида азота – нитрат- и нитрит-анионов, их суммарной концентрации ($\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$), а также 3-нитротирозина.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 55 пациентов в возрасте от 51 года до 67 лет, находившиеся на стационарном лечении. Обследуемые были разделены на 2 группы. 1-ю группу составили 28 пациентов с ХОБЛ II и III стадии, 2-ю – 27 больных ХОБЛ II и III стадии в сочетании с ХИГМ II и III степени тяжести. Пациенты обеих групп на момент обследования имели стабильное течение ХОБЛ.

Критериями включения пациентов с ХОБЛ явились: возраст старше 50 лет, верифицированный диагноз ХОБЛ II и III стадии в период ремиссии согласно GOLD пересмотра 2009 г. (постбронходилатационные показатели объема форсированного выдоха за 1-ю с (ОФВ₁) – 30–80 %, отношения ОФВ₁ к форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) – < 70 %) [1]. При включении в исследование больных с ХОБЛ в сочетании с ХИГМ использовались следующие критерии: отсутствие психических нарушений, соответствие состоянию критериям Международной классификации болезней 10-го пересмотра (цереброваскулярная болезнь, ХИГМ), способность понять цель работы и пройти диагностическое обследование.

Общими критериями исключения из исследования были: обострение ХОБЛ, бронхиальная астма и другие аллергические заболевания, пневмония на момент госпитализации, выраженная застойная сердечная недостаточность, длительный прием системных глюкокортикостероидов, наличие грубых когнитивных расстройств, деменции различных степеней тяжести, психических заболеваний.

Контрольная группа состояла из 26 практически здоровых некурящих добровольцев.

Исследование ФВД проводили на компьютерном спирографе *SpiroLab III* (Италия) с анализом кривой "поток–объем" и оценкой постбронходилатационных показателей ОФВ₁ и ОФВ₁ / ФЖЕЛ.

Исследование метаболизма NO проводилось путем регистрации концентрации его стабильных метаболитов – нитрат- и нитрит-анионов, $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$, а также 3-нитротирозина в сыворотке крови.

Определение концентрации нитритов осуществлялось спектрофотометрически с использованием реактива Грисса [15]. Нитраты, содержащиеся в пробах, предварительно восстанавливались до нитритов нитрат-редуктазой. Содержание 3-нитротирозина определялись с применением иммуоферментного анализа с помощью наборов HVTm jп.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программного пакета *Statistica 6.0*. Достоверность различий между исследуемыми группами вычислялась при помощи непарного t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

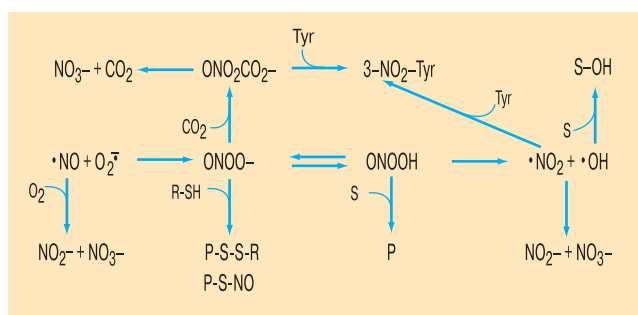


Рис. 1. Схема превращения оксида азота в организме
Примечание: Tyr – тирозин; S – субстрат; P – продукт.

Результаты

Во всех группах содержание 3-нитротирозина не превышало нижнего порога чувствительности метода, который составил 3,2 нг / мл. На рис. 2 приведены данные исследования уровня нитрат-анионов сыворотки крови. Среднее значение показателя в контрольной группе составило $12,5 \pm 3,8$ мкМ. Выявлено достоверное увеличение, по сравнению с контролем, содержания нитрат-анионов при ХОБЛ и сочетании ХОБЛ и ХИГМ ($23,5 \pm 8,8$ мкМ при $p < 0,05$ и $27,8 \pm 10,5$ мкМ при $p < 0,05$ соответственно) в 1,88 и 2,22 раза.

При исследовании содержания нитрит-анионов обнаружено их достоверное повышение при ХОБЛ в сравнении с группой контроля ($3,67 \pm 1,1$ мкМ и $1,59 \pm 0,8$ мкМ соответственно; $p = 0,03$). У больных с ХОБЛ в сочетании с ХИГМ средняя концентрация NO_2^- составила $7,7 \pm 6,0$ мкМ (рис. 3). Зарегистрированные значения в группе с сочетанием ХОБЛ и ХИГМ связаны с изменением цикла метаболизма NO с превалированием активности нитрит-редуктазных систем и нарушением равновесия в цепочке $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO}$.

Среднее процентное соотношение содержания стабильных метаболитов NO было следующим: в контрольной группе – 11 % NO_2^- и 89 % NO_3^- , в 1-й группе – 14 % NO_2^- и 86 % NO_3^- , во 2-й группе – 22 % NO_2^- и 78 % NO_3^- . Корреляционные связи между уровнем нитрит- и нитрат-анионов не установлены ни в одной из групп. Отсутствие линейной зависимости между измеренными параметрами свидетельствует о сложных механизмах регуляции цикла метаболизма NO, обусловленными взаимодействиями оксида азота, его активных форм и стабильных метаболитов с различными соединениями (рис. 1), а также уровнем активности нитрит-синтазных и нитрит-редуктазных систем [16].

Результаты измерения $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ в сыворотке крови в исследуемых группах представлены на рис. 4. У больных с ХОБЛ, как и при сочетании ХОБЛ и ХИГМ, обнаружено достоверное повышение $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ по сравнению с контрольными значе-

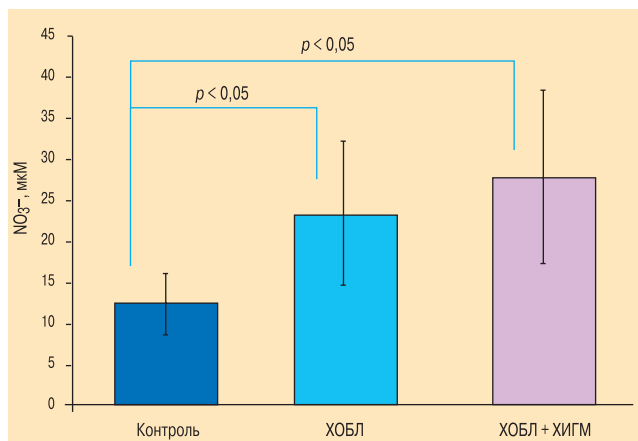


Рис. 2. Уровень нитрат-анионов в крови у пациентов с ХОБЛ и сочетанием ХОБЛ и ХИМ

Примечание: p – различия между изучаемыми группами статистически достоверны.

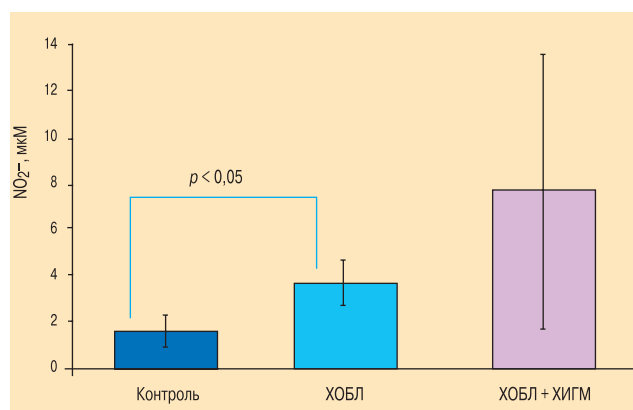


Рис. 3. Содержание нитрит-анионов в крови у пациентов с ХОБЛ и сочетанием ХОБЛ и ХИГМ

Примечание: p – статистически значимые различия между изучаемыми группами.

ниями. Однако достоверных различий между группами не выявлено.

При оценке корреляций во всех исследованных группах между показателями метаболизма NO и параметрами функции внешнего дыхания обнаружена достоверная отрицательная коррелятивная связь только между уровнем нитрит-анионов в крови и ОФВ_1 ($r = -0,77$; $p < 0,05$) у пациентов с ХОБЛ. Эти данные свидетельствуют о том, что выявленное изменение цикла метаболизма NO при ХОБЛ связано в первую очередь с напряженностью нитрозивного стресса. При сочетании ХОБЛ с ХИГМ линейная зависимость между изученными параметрами отсутствует, что, по всей видимости, обусловлено различной активностью реакций, протекающих по нитрит-редуктазному или нитрит-синтазному пути.

Заключение

Выяснение роли NO в патогенезе различных респираторных патологий и сопутствующих им заболеваний остается актуальной проблемой. Сложность интерпретации результатов, получаемых при исследовании метаболизма NO на системном уровне, связана с тем, что оксид азота, помимо участия в развитии нитрозивного стресса, как высокоактивный

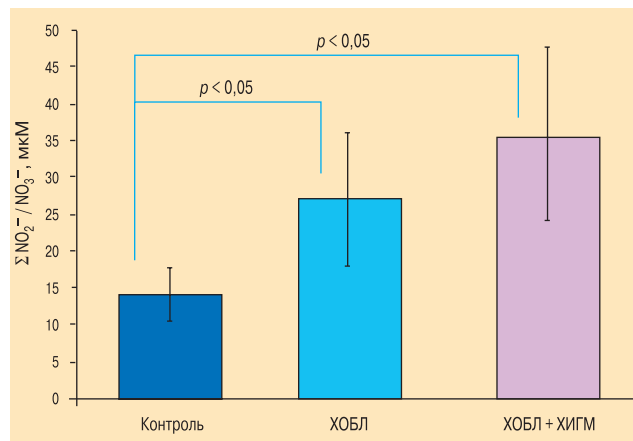


Рис. 4. Суммарная концентрация нитратов и нитритов в крови у пациентов с ХОБЛ и сочетанием ХОБЛ и ХИГМ

Примечание: p – статистически значимые различия между изучаемыми группами.

радикал вовлекается и в регуляцию множества физиологически важных функций (вазодилатации, нейротрансмиссии, реакций иммунной системы, регуляции тонуса гладких мышц и т. д.).

В настоящей работе показано достоверное повышение уровня стабильных метаболитов NO на системном уровне при ХОБЛ и при сочетании ХОБЛ и ХИГМ в сравнении со здоровыми лицами. Обнаружена достоверная отрицательная коррелятивная связь между уровнем NO₂⁻ в крови и ОФВ₁ ($r = -0,77$; $p < 0,05$) у пациентов с ХОБЛ. Полученные данные свидетельствуют о том, что при ХОБЛ, даже в стадии ремиссии, наблюдаются изменения метаболизма NO, характерные для нитрозивного стресса. При сочетании ХОБЛ с ХИГМ изменение исследованных показателей помимо нитрозивного стресса, очевидно, связано с особенностями функционирования нитрит-редуктазных систем.

Таким образом, широкий спектр биохимических и патофизиологических эффектов NO, влияющих на процессы клеточной регуляции, его высокая биологическая активность делают перспективными исследования данного маркера при оценке состояния пациентов как с ХОБЛ, так и при сочетании ХОБЛ с ХИГМ.

Литература

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease. Update 2009. Medical communications resources, Inc.; 2009 (10).
2. Безлепко А.В., Захарова П.К., Безлепко Е.А. Сопутствующие заболевания у больных ХОБЛ. В кн.: Сборник трудов XX Национального конгресса по болезням органов дыхания, М.; 2010. 442–443.
3. Ванин А.Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований. Биохимия 1998; 63 (7): 867–869.
4. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник. Соросов. образоват. журн. 2000; 12: 27–34.
5. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях. Вестн. РАМН 2000; 4: 3–5.
6. Cookson W. Polygenes, asthma, and atopy. In: From Genetics to quality of life: XV World congress of asthmology. Seattle; 1996. 15–19.
7. Raychaudhuri B., Dweik K., Connors M.J. et al. Nitric oxide blocks nuclear factor-kappa B activation in alveolar macrophages. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1999; 21 (3): 311–316.
8. Carratu P., Scoditti C., Maniscalco M. Exhaled and arterial levels of endothelin-1 are increased and correlate with pulmonary systolic pressure in COPD with pulmonary hypertension. BMC Pulm. Med. 2008; 8 (5): 154–158.
9. Corradi M., Pesci A., Casana R. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. Nitric Oxide 2003; 8 (1): 26–30.
10. Barnes P.J., Dweik R.A., Gelb A.F. et al. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. Chest 2010; 138: 682–692.
11. Blake M.J., Klevay L.M., Halas E.S., Bode A.M. Blood pressure and heat shock protein expression in response to acute and chronic stress. Hypertension 1995; 25 (1): 539–544.
12. Нечипуренко Н.И., Пашковская И.Д., Мусиенко Ю.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга. Мед. новости 2008; 1: 7–13.
13. Davis K.L., Martin E., Turko I.V., Murad F. Novel effects of nitric oxide. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2001; 41: 203–236.
14. Debon P. C., Tannenbaum S. R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. Arch. Biochem. Biophys. 2004; 423 (1): 12–22.
15. Климанов И.А. Изучение метаболизма оксида азота при бронхиальной астме: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2006.
16. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука; 1998.

Информация об авторах

Соодаева Светлана Келдибековна – д. м. н., проф., зав. лабораторией клинической и экспериментальной биофизики ФГУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России; тел.: (495) 465-52-64; e-mail: soodaeva@mail.ru
 Климанов Игорь Александрович – к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории клинической и экспериментальной биофизики ФГУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России; тел.: (495) 465-52-64; e-mail: igorklimanov@yandex.ru
 Ли Тимур Владимирович – аспирант кафедры неврологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова; тел.: (499) 400-45-18; e-mail: dr.li@inbox.ru
 Федин Анатолий Иванович – д. м. н., проф., зав. кафедрой неврологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова; тел.: (499) 400-45-18; e-mail: fedin.anatoly@gmail.com
 Миронова Ольга Петровна – к. м. н., проф. кафедры неврологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздравсоцразвития России; тел.: (499) 400-45-18; e-mail: nevroks@gmail.com
 Постникова Лариса Борисовна – д. м. н., руководитель Городского консультативного центра для больных ХОБЛ МЛПУ "Городская больница № 28"; тел.: (831) 276-84-12; e-mail: plbreath@mail.ru
 Кубышева Наиля Исхаковна – к. б. н., врач-иммунолог иммунологической лаборатории МЛПУ "Детская городская больница № 27 "Айболит"; тел.: +7-910-796-98-38; e-mail: aibolit70@mail.ru

Поступила 12.12.11

© Коллектив авторов, 2012

УДК [616.24-036.12-06:616.831-005.4]-07:616-008.931-074