

Оригинальные исследования

Л.Б.Постникова¹, Н.И.Кубышева², М.В.Болдина¹, Т.В.Ли³, И.А.Климанов⁴, В.В.Новиков⁵

Нитрозивный стресс и растворимые дифференцировочные молекулы при обострении хронической обструктивной болезни легких

- 1 – Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Нижегородской области "Городская больница № 28" (Городской консультативный центр для больных ХОБЛ): 603035, Нижний Новгород, ул. Чаадаева, 7;
 2 – Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Нижегородской области "Детская городская клиническая больница № 27 "Айболит": 603035, Нижний Новгород, ул. Ярошенко, 7а;
 3 – ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1;
 4 – ФГУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России: 105077, Москва, ул. 11-я Парковая, 32, корп. 4;
 5 – НИИ молекулярной биологии и региональной экологии Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

L.B.Postnikova, N.I.Kubysheva, M.V.Boldina, T.V.Li, I.A.Klimanov, V.V.Novikov

Nitrous stress and soluble differentiation molecules in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease

Summary

The aim of this study was to investigate nitrite blood levels (NO_2^-) and the total nitrite and nitrate concentration ($\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) in the exhaled breath condensate (EBC) and to evaluate interrelationships between NO metabolites and serum sCD50, sCD54, sHLA-I, sCD95 soluble differentiation molecules in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We examined 110 patients with exacerbation of COPD stages I–III and 28 healthy non-smokers. Exacerbation of COPD stages II and III was found to be related to a significant increase in NO_2^- level in the blood and ($\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) in EBC, increased concentrations of sCD50, sCD54, sHLA-I molecules and decreased concentration of sCD95 molecules. Statistically significant strong relationships were found between nitrous stress parameters and serum concentrations of soluble differentiation molecules in exacerbation of COPD. These data could indicate a role of soluble sCD50, sCD54, sHLA-I, sCD95 molecules and nitrous stress in the pathogenesis of COPD progression. These biomarkers could be used as predictors of poor prognosis of early-stage COPD and as diagnostic criteria of exacerbation of COPD stages II–III.

Key words: exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, nitrous stress, exhaled breath condensate, soluble differentiation molecules, predictors.

Резюме

Целью исследования было изучение содержания нитритов в крови (NO_2^-), суммарной концентрации нитритов и нитратов ($\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ), оценка взаимосвязей между уровнем метаболитов оксида азота и сывороточным содержанием растворимых дифференцировочных молекул sCD50, sCD54, sHLA-I, sCD95 у больных с обострением хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Были обследованы 110 пациентов с обострением ХОБЛ I–III стадии и 28 здоровых некурящих лиц. Показано, что обострение ХОБЛ II и III стадии связано с достоверным повышением уровня NO_2^- в крови ($\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) и в КВВ, увеличением в циркуляции содержания sCD50, sCD54, sHLA-I и снижением сывороточной концентрации sCD95 молекул. Обнаружены сильные статистически значимые связи между параметрами нитрозивного стресса и сывороточным содержанием растворимых дифференцировочных молекул при обострении ХОБЛ. Полученные данные свидетельствуют о патогенетической роли нитрозивного стресса и растворимых форм молекул sCD50, sCD54, sHLA-I, sCD95 в прогрессировании ХОБЛ. Изученные маркеры можно использовать в качестве предикторов неблагоприятного прогноза ХОБЛ на ранних стадиях и в качестве критериев в диагностике обострений ХОБЛ II и III стадии.

Ключевые слова: обострение хронической обструктивной болезни легких, нитрозивный стресс, конденсат выдыхаемого воздуха, растворимые дифференцировочные молекулы, предикторы.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – это распространенное заболевание с высоким уровнем летальности, в развитии которого участвуют многие патогенетические механизмы [1]. Интенсивность воспалительных реакций при ХОБЛ определяется активностью клеточных и молекулярных факторов, таких как нейтрофилы, активные формы кислорода (АФК), протеиназы, провоспалительные цитокины, хемокины и др. Активно изучаются иммунологические аспекты воспаления, которые легли в основу гипотезы аутоиммунности патогенеза ХОБЛ [2, 3].

Особое внимание исследователей направлено на уточнение роли оксида азота (NO) и его метаболитов в патогенезе ХОБЛ. Оксид азота непрерывно синтезируется ферментативным путем из L-аргинина под влиянием конститутивной или индуцибельной NO-синтазы (NOS). Известно, что воспалительные реакции сопровождаются избыточной секрецией провоспалительных цитокинов (интерлейкинов 1β и 8, фактора некроза опухоли α), что вызывает повышенное образование индуцибельной формы NO-синтазы (iNOS). В свою очередь, именно iNOS является источником образования молекул NO, обладающих

деструктивным потенциалом и ответственных за прогрессирование воспалительного ответа при многих заболеваниях [4]. С другой стороны, молекулы NO могут появляться неферментативным путем – за счет восстановления нитритов и нитратов (NO_2^- и NO_3^-) до оксида азота. Эта реакция может протекать как прямое восстановление NO_3^- (например, ионами железа) при $\text{pH} < 6$, т. е. при состояниях, сопровождающихся закислением среды, например при воспалении.

Кроме того, NO сам способен к ионизации с образованием NO_2^- , NO_3^- , нитроксил-аниона, пероксинитрита, имеющих деструктивный потенциал. Таким образом, изучение роли NO в развитии воспаления у больных ХОБЛ представляется актуальным, т. к. позволяет дополнить представления о патогенезе воспаления. Учитывая, что нестабильность NO делает непригодными стандартные методы его определения, метаболиты NO могут использоваться как косвенные маркеры концентрации NO в организме [5].

Как было отмечено ранее, в развитии ХОБЛ особая роль отводится нарушениям иммунологической реактивности организма, которые проявляются изменением состава и активности иммунокомпетентных клеток. Активация клеток иммунной системы связана с появлением на их поверхности мембранных белков ("активационных" антигенов). Большое количество дифференцировочных антигенов выступают как маркеры активации. Среди них можно выделить молекулы адгезии (CD50, CD54) и молекулы главного комплекса гистосовместимости (HLA I, HLA DR), CD95-рецепторы апоптоза. Относительно недавно установлено, что активация лимфоцитов сопровождается появлением в крови и других биологических средах растворимых форм дифференцировочных молекул их мембранных гомологов [6]. Растворимые формы дифференцировочных молекул включены в глобальную иммунологическую сеть наряду с цитокинами, антителами, Т- и В-лимфоцитами. Они выполняют множество функций, модулируя иммунные реакции путем связывания с лигандами своих мембранных гомологов на поверхности клеток, и являются межклеточными белковыми коммуникаторами. В настоящее время накапливаются данные об участии растворимых форм мембранных молекул в патогенезе многих заболеваний.

Целью исследования явилось изучение уровня нитритов в крови, оценка суммарной концентрации нитритов / нитратов ($\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) с оценкой связей между уровнем метаболитов оксида азота и сывороточным содержанием растворимых форм дифференцировочных молекул sCD95, sCD50, sCD54, sHLA-I у больных с обострением ХОБЛ различной степени тяжести

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 138 человека, из них 28 здоровых некурящих лиц (средний возраст – $37,1 \pm 3,8$ года). Всех пациентов с обострением

ХОБЛ ($n = 110$) разделили на 3 группы с учетом стадии заболевания согласно рекомендациям по диагностике, лечению и профилактике ХОБЛ [7]. Для участия в исследовании были отобраны больные с I–III стадией ХОБЛ, госпитализированные по поводу обострения в терапевтическое отделение МЛПУ "Городская больница № 28" г. Нижнего Новгорода, отвечающие следующим критериям: возраст > 40 лет, фактор риска – курение, клинические симптомы обострения ХОБЛ, объем формированного выдоха за 1-ю с (ОФВ₁) – 80–30 %, ОФВ₁ / ФЖЕЛ < 70 % (ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких). Критериями исключения были: бронхиальная астма и другие аллергические заболевания, пневмония на момент госпитализации, выраженная застойная сердечная недостаточность, тяжелая артериальная гипертензия, сахарный диабет, состояния, требующие длительного приема системных глюкокортикостероидов.

Исследование функции внешнего дыхания проводили на компьютерном спирографе *SpiroLab II* (Италия), анализируя кривую "поток–объем" и оценивая постбронходилататорные показатели ОФВ₁, ОФВ₁ / ФЖЕЛ, емкость вдоха ($E_{\text{вд}}$). Демографические и функциональные характеристики больных ХОБЛ представлены в таблице.

У всех обследованных лиц утром натощак проводили забор крови из локтевой вены и собирали КВВ в течение 20 мин после полоскания ротовой полости с помощью системы *R-tube* (США), исключающей попадание слюны в КВВ. Содержание NO_2^- в крови определяли по методике П.П.Голыкова и соавт. [8]. $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ в КВВ определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса и кадмиевого восстановителя [9].

Уровень растворимых форм молекул sCD95, sCD50 (sICAM-3), CD54 (sICAM-1), sHLA-I в крови определяли иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител серии ИКО и поликлональных антител против антигенов мононуклеарных клеток крови человека [10].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерных программ "Биостатистика" и *Statgraf*. Рассчитывали среднее значение

Таблица
Характеристика пациентов
с обострением ХОБЛ ($M \pm m$)

Параметры	1-я группа (ХОБЛ I стадии)	2-я группа (ХОБЛ II стадии)	3-я группа (ХОБЛ III стадии)
<i>n</i>	38	42	30
Возраст, лет	60,5 ± 7,1	61,7 ± 5,6	66,2 ± 6,3
Пол, м / ж	31 / 7	36 / 6	30 / 0
Индекс курения, пачек / лет	33,7 ± 6,2	38,3 ± 5,8	42,5 ± 9,2
Экс-курль- щики, <i>n</i>	3	6	4
ОФВ ₁ , л / %	2,72 ± 0,88 / 85,1 ± 5,7	1,82 ± 0,39 / 62,8 ± 5,6	1,25 ± 0,22 / 44,5 ± 4,9
ОФВ ₁ / ФЖЕЛ	67,2 ± 3,1	61,6 ± 4,4	49,1 ± 7,9
$E_{\text{вд}}$, (%)	84,7 ± 8,4	68,5 ± 7,8	53,11 ± 9,8

(*M*) и среднеквадратичное отклонение (*m*). С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (*r*).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования одного из стабильных метаболитов NO в крови – нитритов (NO_2^-) – представлены на рис. 1. Обострение ХОБЛ характеризовалось статистически значимым повышением циркулирующего содержания NO_2^- у пациентов со II и III стадией заболевания по сравнению как со здоровыми некурящими лицами, так и с пациентами 1-й группы. Уровень NO_2^- в крови у больных с тяжелым течением ХОБЛ составил $5,87 \pm 0,77$ мкмоль / л и был в 1,5 раза выше ($p = 0,0016$), чем у пациентов 2-й группы ($3,8 \pm 0,3$ мкмоль / л).

С учетом низкого содержания отдельных форм метаболитов NO (NO_3^- и NO_2^-) в КВВ [9] было проведено определение в изучаемой биологической среде у больных ХОБЛ $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ (рис. 2). Отличительная особенность изменений $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ в КВВ при обострении ХОБЛ – это достоверное повышение содержания изучаемого параметра у боль-

ных с умеренными и тяжелыми нарушениями бронхиальной проходимости относительно группы сравнения ($5,57 \pm 1,1$ мкмоль / л). Во 2-й группе (II стадия ХОБЛ) $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ в КВВ была в 1,9 раза выше ($10,7 \pm 0,7$ мкмоль / л; $p = 0,0001$) по сравнению со здоровыми некурящими лицами и в 1,6 раза ($p = 0,011$) превышала уровень $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ пациентов 1-й группы (I стадия). При тяжелом течении ХОБЛ (3-я группа) $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ в КВВ ($12,2 \pm 2,3$ мкмоль / л) была в 2,2 раза выше, чем у здоровых некурящих добровольцев ($p = 0,042$), и в 1,8 раза – чем у пациентов с I стадией заболевания. Статистически значимых различий между значениями данного показателя во 2-й и 3-й группе не зарегистрировано.

Таким образом, одновременное нарастающее увеличение содержания стабильных метаболитов NO на системном и топическом уровне у пациентов с обострением ХОБЛ различной степени тяжести может свидетельствовать о патогенетической роли нитрозивного стресса в прогрессировании хронического воспаления.

В результате исследования содержания растворимых дифференцировочных молекул в крови при обострении ХОБЛ (рис. 3) установлено достоверное увеличение уровня молекул sCD50 во 2-й и 3-й группе относительно здоровых лиц ($351,4 \pm 45,7$ Ед. / мл). Статистически значимое повышение уровня sCD54 и снижение содержания sCD95, по сравнению с контрольными значениями, отмечено только при III стадии болезни. Кроме того, в 3-й группе пациентов зарегистрировано достоверное 2-кратное нарастание концентрации растворимых молекул HLA I ($2242,4 \pm 334,1$ Ед. / мл; $p = 0,036$), по сравнению с группой сравнения ($1224,8 \pm 209,2$ Ед. / мл).

Известно, что растворимые формы молекул CD95 при связывании с Fas-лигандом способны блокировать CD95-опосредованный апоптоз [11]. Таким образом, снижение уровня sCD95 белков у больных ХОБЛ может влиять на механизмы реализации Fas-зависимой программируемой клеточной гибели и усиливать апоптоз клеток воспаления.

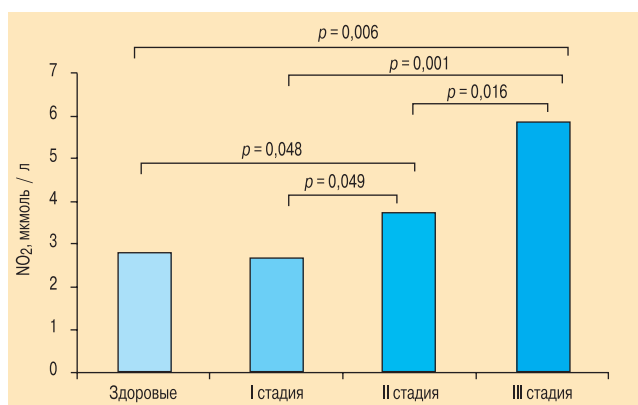


Рис. 1. Содержание нитритов в крови у пациентов с обострением ХОБЛ
Примечание: *p* – статистически значимые различия между изучаемыми группами.

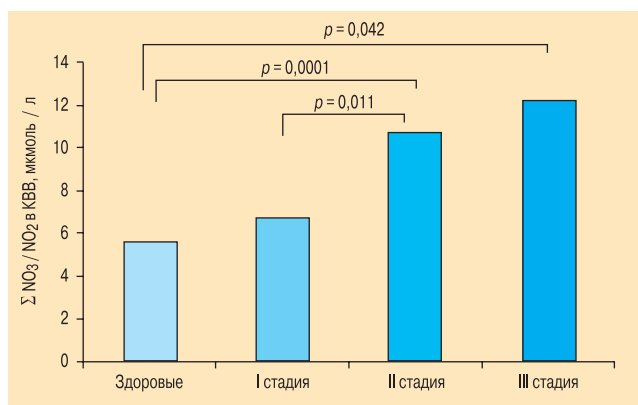


Рис. 2. Суммарная концентрация нитратов / нитритов в КВВ у пациентов с обострением ХОБЛ.
Примечание: $\Sigma \text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ – суммарная концентрация нитратов / нитритов; *p* – статистически значимые различия между изучаемыми группами.

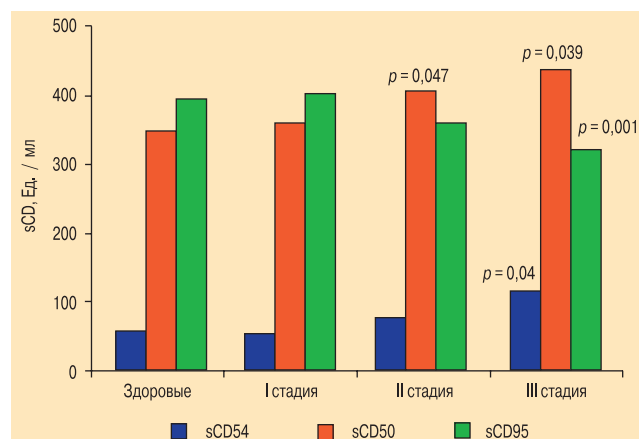


Рис. 3. Содержание растворимых форм молекул sCD50, sCD54, sCD95 в крови у пациентов с обострением ХОБЛ
Примечание: *p* – достоверность различий относительно здоровых некурящих лиц.

Ранее было показано, что избыточное образование молекул NO также способно инициировать клеточную гибель при участии Fas-лиганда [12].

Эти данные подтверждаются развитием достоверных отрицательных корреляций между системным уровнем NO_2^- и содержанием sCD95 в крови ($r = -0,44$; $p = 0,023$), которые выявлены в настоящем исследовании у больных с обострением ХОБЛ. Таким образом, следует подчеркнуть, что определенная биологическая роль системного нитрозивного стресса в прогрессировании ХОБЛ может быть связана с усилением программированной гибели клеток.

Другим обоснованием этого постулата служат прямые ассоциации $\Sigma \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ в КВВ и сывороточного уровня sHLA-I ($r = 0,80$; $p = 0,001$). Одной из функций sHLA-I молекул является их модулирующее влияние на интенсивность процессов апоптоза [13]. При связывании со своим лигандом (CD8-антигеном) sHLA-I молекулы угнетают функциональную активность Т-лимфоцитов CD8^+ и при этом индуцируют секрецию растворимого Fas-лиганда, что также усиливает апоптоз клеток [6].

Таким образом, полученные данные указывают на опосредуемую роль NO в запуске программируемой гибели клеток с участием молекул sCD95 и sHLA I. Эти механизмы могут усиливать развитие деструкции легочной ткани и, как следствие, прогрессирование топического воспаления при ХОБЛ. Известно также, что основная роль молекул гистосовместимости I класса заключается в реализации и регуляции иммунного ответа, в процессах взаимодействия иммунокомпетентных клеток, распознавания своих и чужеродных, в т. ч. измененных собственных клеток [14]. Это свидетельствует о том, что изменение механизмов метаболизма NO (растормаживание нитрозивного стресса), вероятно, влияет как на интенсивность экспрессии антигенов HLA I+ на мембранах клеток, так и на образование молекул sHLA I.

Биологическая роль растворимых молекул sICAM-3 и sICAM-1 заключается в торможении процессов адгезии, связанных с клеточной миграцией, что позволяет рассматривать их избыточное накопление в циркуляции при обострении ХОБЛ в качестве неблагоприятных факторов, т. к. блокируется возможность клеток-эффекторов реализовать свои функции в очаге воспаления. Возможно, повышение концентрации растворимых форм молекул адгезии в крови, выявленное при активации воспалительных реакций у пациентов с обострением ХОБЛ, способствует ограничению миграции иммунокомпетентных клеток во флогенный очаг, что изменяет нормальный противовоспалительный ответ.

Заключение

Для диагностики обострения и тяжести ХОБЛ в настоящий момент используют клинико-функциональные критерии. При этом изучение маркеров воспаления у пациентов ХОБЛ в различных биологических средах позволяет оценивать особенности

метаболизма провоспалительных цитокинов, АФК и других молекулярных компонентов с учетом активности воспалительных реакций и стадии болезни. Эти данные подтверждают необходимость дальнейшего изучения патогенетических факторов при ХОБЛ для разработки новых критериев активности воспаления и тяжести заболевания, совершенствования диагностики и оптимизации терапии у больных с различными фенотипами (частые обострения, ХОБЛ у лиц моложе 40 лет, быстрое прогрессирование и т. д.).

В настоящем исследовании у больных с обострением ХОБЛ II и III стадии установлены достоверное увеличение уровня метаболитов NO в крови и КВВ, повышение сывороточного содержания растворимых форм молекул адгезии (CD50, sCD54) и гистосовместимости I класса (sHLA I), а также снижение концентрации белков sCD95. Кроме того, обострение ХОБЛ сочеталось с появлением сильных корреляций между нитрозивным стрессом и уровнем растворимых дифференцировочных молекул.

Выявленные особенности динамики содержания изученных молекулярных маркеров у пациентов с обострением ХОБЛ II и III стадии можно рассматривать в качестве дополнительных критериев активации воспаления и тяжести болезни. С другой стороны, высокие концентрации системных и топических метаболитов NO, повышение уровня sCD50, sCD54, sHLA I молекул и снижение содержания sCD95 белков в крови на ранних стадиях ХОБЛ могут служить предикторами особых фенотипов болезни и влиять на выбор базисной терапии.

Литература

1. Mannino D.M., Buist S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370: 765–773.
2. Barnes P.J., Celli B.R. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur. Respir. J.* 2009; 33 (5): 1165–1185.
3. Cosio M.G., Saetta M., Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 2445–2454.
4. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов. *Успехи биол. химии* 2007; 47: 259–292.
5. Guevara I., Iwanek J., Dembinska-Kiec A. et al. Determination of nitrite / nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chim. Acta* 1998; 274 (2): 177–188.
6. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. М.: Изд-во МИА; 2008.
7. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease. Date last accessed: June 30 2007.
8. Голиков П.П. Метод определения нитрита / нитрата в сыворотке крови. *Биомед. химия* 2004; 50 (1): 79–85.
9. Климанов И.А. Изучение метаболизма оксида азота при бронхиальной астме: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2006.
10. Максимова А.В., Кубышева Н.И., Ермолаева Е.В. и др. Сывороточное содержание растворимых антигенов ад-

- гезии и молекул гистосовместимости у детей с бронхиальной астмой. Аллергология 2005; 4: 30–34.
11. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов. Рос. биотер. журн. 2002; 3 (1): 27–33.
 12. Williams M.S., Noguchi S., Henkart P.A. et al. Nitric oxide synthase plays a signaling role in TCR-triggered apoptotic death. J. Immunol. 1998; 161: 6526–6531.
 13. Zavazava N., Kronrke M., Soluble H.L. A class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. Nature Med. 1996; 2: 1005–1007.
 14. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека. Иммунология 2001; 3: 4–12.

Информация об авторах

Постникова Лариса Борисовна – д. м. н., доцент, руководитель "Городского консультативного центра для больных с хроническими

обструктивными заболеваниями легких", ГБУЗ НО "Городская больница № 28"; тел.: (831) 276-84-12; e-mail: plbreath@mail.ru
 Кубышева Наиля Исаковна – к. б. н., врач-иммунолог ГБУЗ НО "Детская городская клиническая больница № 27 "Айболит"; тел.: (831) 271-74-36; e-mail: aibolit70@mail.ru
 Болдина Марина Викторовна – врач-пульмонолог "Городского консультативного центра для больных с хроническими обструктивными заболеваниями легких", ГБУЗ НО "Городская больница № 28"; тел.: (831) 276-84-12; e-mail: mari.boldina@mail.ru
 Ли Тимур Владимирович – аспирант кафедры неврологии ФУВ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздравсоцразвития России; тел.: (499) 400-45-18, e-mail: dr.li@inbox.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: igorkli-manov@yandex.ru
 Новиков Виктор Владимирович – д. б. н., проф., академик РАЕН, директор НИИ молекулярной биологии и региональной экологии Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского; тел.: (831) 465-28-68; e-mail: mbre@mail.ru

Поступила 14.11.11
 © Коллектив авторов, 2012
 УДК 616.24-036.12-092