

Клеточный состав индуцированной мокроты и оксид азота в конденсате выдыхаемого воздуха при бронхиальной астме

Волкова Л.И.¹, Капитанова Д.В.², Боярко В.В.³, Сапрыкина Э.В.⁴

Induced sputum cytology and nitric oxide in exhaled breath condensate in bronchial asthma patients

Volkova L.I., Kapitanova D.V., Boyarko V.V., Saprykina E.V.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Городская больница № 3, г. Томск

³ Томский военно-медицинский институт, г. Томск

⁴ Центральная научно-исследовательская лаборатория СибГМУ, г. Томск

© Волкова Л.И., Капитанова Д.В., Боярко В.В., Сапрыкина Э.В.

Изучен клеточный состав индуцированной мокроты и содержание оксида азота в конденсате выдыхаемого воздуха у больных с обострением бронхиальной астмы и динамика этих показателей на фоне терапии глюкокортикостероидами. Обследовано 64 пациента с различной степенью тяжести бронхиальной астмы. Группу контроля составили 20 здоровых добровольцев. Показано, что мониторинг показателей индуцированной мокроты и содержания оксида азота является информативным в оценке эффективности противовоспалительной терапии бронхиальной астмы.

Ключевые слова: бронхиальная астма, индуцированная мокрота, оксид азота, глюкокортикостероиды.

Induced sputum cytology, nitric oxide content in exhaled breath condensate and dynamics of these parameters against the background of glucocorticosteroid therapy were studied in patients with bronchial asthma exacerbation. Sixty four patients with different degree of bronchial asthma were included. The control group was represented by 20 healthy volunteers. It is shown, that monitoring of induced sputum and nitric oxide indices is informative to assess efficiency of anti-inflammatory therapy in bronchial asthma patients.

Key words: bronchial asthma, induced sputum, nitric oxide, glucocorticosteroids.

УДК 1.12.06. 616.248-008.8-074

В настоящее время бронхиальная астма (БА) рассматривается как хронический воспалительный процесс в дыхательных путях, а ее симптомы и выраженность являются его следствием. В связи с этим был разработан новый подход к терапии БА, так называемая базисная терапия — длительное использование противовоспалительных средств, направленное на подавление воспаления и контроль заболевания [4].

Оптимальный мониторинг влияния противовоспалительной терапии при БА очень важен, так как больные могут нуждаться в длительном, иногда пожизненном применении препаратов. Наиболее эффективными противовоспалительными препаратами являются ингаляционные глюкокортикостероиды (ИГКС). Они угнетают синтез цитокинов, миграцию эозинофилов в дыхательные пути и высвобождение медиаторов воспаления [8]. Для диагностики и контроля динамики бронхиального воспаления на фоне терапии ИГКС золотым стан-

дартом является оценка биоптатов из проксимальных бронхов, полученных при помощи фибробронхоскопии. Однако к недостаткам этой методики относятся инвазивность и обременительность для больного. Она не рекомендуется при обострениях БА, выраженной дыхательной недостаточности и не может быть использована многократно в клинической практике [1, 17].

В последнее время ведется поиск других маркеров бронхиального воспаления, методика применения которых должна быть неинвазивной, легко применимой и отражающей активность процесса. В настоящий период изучается информативность таких неинвазивных методик, как исследование клеточного состава индуцированной мокроты (ИМ) и уровней оксида азота в выдыхаемом воздухе или в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) [1, 15, 17].

Метод исследования клеточного состава ИМ впервые был предложен для диагностики рака и туберкулеза легких и

в настоящее время используется для выявления инфекционных агентов, изучения клеточных и не клеточных маркеров воспаления при различных заболеваниях легких [1]. По данным некоторых авторов, клеточный состав ИМ у больных БА характеризуется повышением числа и пропорции эозинофилов, причем количество последних возрастает при обострении БА, зависит от ее тяжести и является максимальным при тяжелом течении [11, 13]. Помимо увеличения количества эозинофилов при обострении БА ряд исследователей отмечали появление других метакроматических клеток (базофилы и мастоциты) и увеличение количества нейтрофилов [1, 11]. В исследованиях оценки влияния противовоспалительной терапии ИГКС на клеточный состав ИМ показано достоверное снижение числа эозинофилов [9, 12].

Оксид азота NO — наиболее изученный газ выдыхаемого воздуха [15], однако его исследование в выдыхаемом воздухе с помощью хемилюминесцентного анализатора является высокочувствительной технологией.

В качестве альтернативы был предложен метод исследования содержания метаболитов NO в КВВ. NO продуцируется многими клетками респираторного тракта. При воспалении провоспалительные цитокины и эндотоксины индуцируют экспрессию в клетках индуцибельной изоформы NO-синтазы, увеличивая иногда продукцию NO на порядок, причем эта индукция блокируется ИГКС [15]. Повышение концентрации метаболитов NO в КВВ показано при таких заболеваниях, как БА, бронхоэктазы, муковисцидоз [3, 6, 10, 14]. Под воздействием терапии ИГКС уровни NO снижаются даже до нормальных, а при снижении доз ИГКС возрастают, причем динамика NO опережает изменения других функциональных тестов [7, 16]. Эти данные позволяют предположить, что NO в выдыхаемом воздухе или в КВВ может использоваться для неинвазивного мониторинга бронхиального воспаления, однако в настоящее время еще недостаточно информации о применении метода для контроля лечения БА.

Цель данного исследования — изучить клеточный состав ИМ и содержание метаболитов NO в КВВ при обострении БА и динамику этих показателей на фоне терапии ИГКС.

Материал и методы

В исследование были включены 64 пациента в возрасте от 18 до 72 лет (средний возраст $(52,4 \pm 13,5)$ года), находившихся на стационарном лечении по поводу обострения БА. Степень тяжести и фаза заболевания определялись соглас-

но международным рекомендациям [4]. У 18 пациентов диагностирована БА легкого персистирующего течения, у 41 — средней и у 5 — тяжелой степени. Критерием исключения из исследования было обострение крайне тяжелой степени (астматический статус), гормонозависимое течение БА. Группу контроля составили 20 некурящих, практически здоровых добровольцев.

У всех пациентов ежедневно оценивали симптомы БА: кашель, одышку, количество мокроты по шкале от 0 до 5 баллов, количество приступов удушья и потребность в β_2 -агонистах короткого действия. Дважды в сутки измерялась пиковая скорость выдоха (ПСВ). До и после купирования обострения проводилось спирометрическое исследование с бронхолитиком на аппарате «Masterscreen Pneumo» («Erich Jaeger», Германия), изучение клеточного состава ИМ и уровней NO в КВВ. Сбор ИМ и подсчет клеточного состава выполняли по описанной в литературе методике [1, 11, 13]. Сбор КВВ и измерение уровней метаболитов NO осуществляли по методике с использованием реактива «Griess», с регистрацией оптической плотности на микропланшетном спектрофотометре и определением концентрации NO по калибровочной кривой [2, 5].

Статистическую обработку выполняли, используя программу Statistica 6.0. Данные представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее арифметическое значение, SD — стандартное отклонение. Оценку достоверности различий при нормальном распределении коэффициента асимметрии проводили с использованием t -критерия Стьюдента. При анализе распределений, отклоняющихся от нормального, использовали непараметрические критерии Вилкоксона и Манна—Уитни.

Все пациенты получали терапию обострения БА — бронхолитик (беродуал, сальбутамол) через небулайзер, суспензию будесонида (пульмикорт, «AstraZeneca AB») в дозе 2—4 мг/сут через небулайзер (38 пациентов) или преднизолон перорально в начальной дозе 30 мг/сут с дальнейшим ее снижением (26 пациентов). Критериями эффективности лечения обострения БА были увеличение ПСВ, уменьшение приступов удушья и потребности в β_2 -агонистах короткого действия, восстановление нормальной физической активности. После купирования обострения БА базисная противовоспалительная терапия проводилась согласно степени тяжести заболевания ИГКС или их комбинацией с длительнодействующими β_2 -агонистами.

Результаты

При анализе клеточного состава ИМ у пациентов с БА по сравнению с контролем отмечено достоверно большее количество нейтрофилов и эозинофилов и меньшее количество альвеолярных макрофагов и лимфоцитов, причем при обострении заболевания эти изменения были более выражены (табл. 1). В фазу обострения также наблюдалось достоверно большее, чем у здоровых, общее количество клеток в 1 мл (цитоз).

Таблица 1

Клеточный состав индуцированной мокроты в период обострения БА и после его купирования ($M \pm SD$)

Показатель	Обострение (n = 64)	Ремиссия (n = 64)	Контроль (n = 20)
Цитоз, ·10 ⁶ /мл	1,50 ± 0,40 ^{1,2}	1,15 ± 0,40	1,09 ± 0,37
Альвеолярные макрофаги, %	43,2 ± 16,2 ^{1,2}	57,2 ± 13,5 ¹	70,2 ± 22,9
Нейтрофилы, %	30,9 ± 14,5 ^{1,2}	26,3 ± 12,1 ¹	23,4 ± 13,7
Эозинофилы, %	22,20 ± 17,40 ^{1,2}	12,70 ± 8,30 ¹	0,55 ± 0,79
Лимфоциты, %	3,8 ± 3,4 ¹	3,9 ± 2,7 ¹	5,57 ± 2,36

¹Различия показателей по отношению к контрольной группе $p < 0,01$.

²Различия показателей до и после лечения обострения БА $p < 0,05$.

При анализе клеточного состава ИМ в зависимости от степени тяжести заболевания при тяжелой БА по сравнению

с легкой и среднетяжелой выявлено достоверно более высокое содержание нейтрофилов как в стадию обострения, так и после его купирования, а также снижение количества эозинофилов при обострении БА (табл. 2). Достоверных различий в клеточном составе ИМ у пациентов с легкой и среднетяжелой БА не получено.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что клеточный состав ИМ зависит от предшествующей базисной терапии [9, 12]. Установить различия в составе ИМ в зависимости от наличия базисной терапии для легкой и тяжелой БА не представлялось возможным, поскольку подавляющее большинство пациентов (89%) с легкой БА не имели базисной терапии до поступления в стационар, а все пациенты с тяжелой БА принимали ИГКС. В группе среднетяжелой БА у пациентов, принимавших препараты базисной терапии, в период обострения было большее содержание альвеолярных макрофагов и меньшее содержание эозинофилов по сравнению с не принимавшими ИГКС (табл. 3).

Содержание метаболитов NO в КВВ в контрольной группе составило (0,88 ± 0,2) мкмоль/л. Повышение концентрации NO наблюдалось у всех пациентов с БА и было максимальным в период обострения (табл. 4).

Таблица 2

Клеточный состав индуцированной мокроты у пациентов с различной степенью тяжести БА ($M \pm SD$)

Показатель	Легкая степень (n = 18)		Средняя степень (n = 41)		Тяжелая степень (n = 5)	
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия
Цитоз, ·10 ⁶ /мл	1,35 ± 0,41	1,03 ± 0,30	1,50 ± 0,40	1,20 ± 0,42	1,90 ± 0,30	1,46 ± 0,60
Макрофаги, %	44 ± 14,0	58,1 ± 11,7	43,6 ± 17,2	57,5 ± 13,9	38,4 ± 16,6	50,2 ± 17,9
Нейтрофилы, %	28,4 ± 13,6	24,6 ± 9,8	30,2 ± 13,0	26,0 ± 12,9	41,4 ± 19,3	33,2 ± 13,5
Эозинофилы, %	22,9 ± 13,8	13,2 ± 9,2	23,0 ± 19,1	12,8 ± 8,1	18,3 ± 15,8	12,1 ± 5,1
Лимфоциты, %	4,6 ± 3,5	4,0 ± 2,9	3,4 ± 3,3	3,7 ± 2,5	3,7 ± 3,5	4,3 ± 3,1

Таблица 3

Клеточный состав индуцированной мокроты у пациентов со среднетяжелой БА в период обострения в зависимости от наличия базисной терапии ($M \pm SD$)

Показатель	ИГКС (n = 26)	Без терапии ИГКС (n = 15)
Цитоз, ·10 ⁶ /мл	1,50 ± 0,50	1,40 ± 0,42
Макрофаги, %	49,7 ± 17,2 ¹	36,5 ± 13,9
Нейтрофилы, %	27,8 ± 16,1	25,4 ± 18,1
Эозинофилы, %	19,0 ± 13,2 ¹	31,4 ± 12,9
Лимфоциты, %	4,2 ± 2,3	3,7 ± 2,5

¹Различия между показателями в группах с терапией ИГКС и без ИГКС, $p < 0,05$.

Таблица 4

Содержание метаболитов NO в конденсате выдыхаемого воздуха в период обострения БА и после его купирования, мкмоль/л ($M \pm SD$)

Обострение (n = 64)	Ремиссия (n = 64)	Ремиссия — группа полного	Ремиссия — группа неполного	Контрольная группа (n = 20)

	контроля (n = 39)	контроля (n = 25)	
	10,3 ± 4,1 ^{1,2}	4,2 ± 2,2 ¹	3,9 ± 2,5 ¹
		4,6 ± 1,8 ¹	0,88 ± 0,2

¹Различия показателей по отношению к контрольной группе, $p < 0,01$.

²Различия показателей до и после купирования обострения БА, $p < 0,01$.

Достоверных различий в содержании метаболитов NO в зависимости от степени тяжести заболевания при обострении БА не обнаружено (табл. 5).

Таблица 5

Содержание метаболитов NO в конденсате выдыхаемого воздуха у пациентов с различной степенью тяжести БА, мкмоль/л ($M \pm SD$)

Период БА	Степень тяжести БА		
	Легкая (n = 18)	Средняя (n = 41)	Тяжелая (n = 5)
Обострение	9,1 ± 4,5 ¹	10,9 ± 4,9 ¹	10,6 ± 3,8 ¹

Ремиссия | 3,6 ± 1,6 4,1 ± 1,9 4,3 ± 2,2

¹ Различия между показателями до и после купирования обострения БА, $p < 0,01$.

Содержание метаболитов NO при обострении БА варьировало в зависимости от предшествующей терапии на амбулаторном этапе. У пациентов со среднетяжелой БА без предшествующей терапии ИГСК уровень NO был более высоким, чем у пациентов, использующих ИГСК (соответственно $(12,0 \pm 2,1)$ и $(9,9 \pm 3,8)$ мкмоль/л, $p < 0,05$). Вероятно, это обусловлено подавлением кортикостероидами транскрипции генов, ответственных за синтез NO-синтазы [7, 16]. Установить различие показателей NO при отсутствии или наличии базисной терапии для легкой и тяжелой БА не представлялось возможным.

К окончанию курса терапии обострения БА, который продолжался от 5 до 11 дней (в среднем $(6,5 \pm 1,6)$ дня), отмечалось улучшение состояния у всех больных. Хороший эффект лечения (достижение ПСВ 80% от должных значений, отсутствие приступов удушья, восстановление нормальной физической активности) наблюдался у 39 пациентов (60,9%), в том числе у 17 пациентов с легкой персистирующей и у 22 со среднетяжелой БА. Неполный контроль симптомов был у 25 пациентов (39,1%), в том числе у 1 пациента с легкой персистирующей БА, у 19 со среднетяжелой и у 5 с тяжелой БА.

После купирования обострения в среднем по группе отмечалось уменьшение цитоза ИМ ($p < 0,001$), количества нейтрофилов ($p < 0,03$) и эозинофилов ($p < 0,001$), увеличение количества альвеолярных макрофагов ($p < 0,001$) (см. табл. 1).

При анализе клеточного состава ИМ в зависимости от уровня достижения контроля симптомов БА выявлено, что в группе пациентов, не достигших полного или хорошего контроля, при обострении БА наблюдалось большее относительное содержание нейтрофилов и меньшее содержание эозинофилов по сравнению с пациентами, имеющими хороший контроль БА. К окончанию курса терапии обострения заболевания в обеих группах происходило снижение количества нейтрофилов и эозинофилов, но у пациентов с неполным контролем сохранялась достоверно более выраженная нейтрофилия ИМ (табл. 6).

Таблица 6

Клеточный состав индуцированной мокроты до и после купирования обострения БА в зависимости от эффективности лечения ($M \pm SD$)

Показатель	Группа полного контроля ($n = 39$)		Группа неполного контроля ($n = 25$)	
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия
Цитоз, $\cdot 10^6/\text{мл}$	$1,40 \pm 0,40^1$	$1,06 \pm 0,25^2$	$1,70 \pm 0,50$	$1,30 \pm 0,50$
Альвеолярные макрофаги, %	$39,0 \pm 15,5$	$58,3 \pm 11,2$	$41,3 \pm 16,5$	$53,3 \pm 16,5$
Нейтрофилы, %	$27,5 \pm 13,6$	$23,8 \pm 8,6^2$	$30,1 \pm 15,4$	$28,1 \pm 15,5$
Эозинофилы, %	$29,2 \pm 19,5^1$	$13,9 \pm 8,9$	$21,9 \pm 16,6$	$12,8 \pm 7,1$
Лимфоциты, %	$4,3 \pm 3,6$	$3,8 \pm 2,8$	$5,0 \pm 3,7$	$4,0 \pm 2,6$

¹ Различия между показателями до начала лечения обострения БА в группах полного и неполного контроля БА, $p < 0,05$.

² Различия между показателями после купирования обострения БА в группах полного и неполного контроля БА, $p < 0,05$.

Отмечено достоверное снижение уровня содержания метаболитов NO, более выраженное в группе пациентов, достигших полного контроля симптомов БА (см. табл. 5). Все пациенты с тяжелой БА имели неполный контроль симптомов, и содержание NO в КВВ у них было выше, чем у пациентов с легкой и средней степенью тяжести, что может быть связано с более выраженной персистенцией воспаления в дыхательных путях (см. табл. 6).

Обсуждение

У пациентов с обострением БА по сравнению со здоровыми наблюдалось достоверное повышение уровня метаболитов NO в КВВ, повышение общего цитоза и относительно количества эозинофилов, нейтрофилов и снижение количества альвеолярных макрофагов в ИМ. После купирования обострения БА происходило достоверное снижение уровня NO в КВВ, уменьшение цитоза, количества нейтрофилов и эозинофилов, увеличение количества альвеолярных макрофагов в ИМ. У пациентов, не достигших хорошего контроля симптомов БА к окончанию курса лечения, уровень метаболитов NO в КВВ и относительное количество нейтрофилов в ИМ было выше, а количество эозинофилов ниже, чем у пациентов, имеющих хороший контроль симптомов БА. При анализе данных в зависимости от степени тяжести заболевания отмечено, что при легкой БА фиксировались наиболее низкие показатели NO как в период обострения заболевания, так и после его купирования. При тяжелой БА отмечалось большее содержание NO в КВВ после курса лечения, повышение относительного количества нейтрофилов в ИМ вне зависимости от фазы заболевания, а также снижение количества эозинофилов при обострении БА. При анализе данных в зависимости от наличия базисной терапии до настоящего обострения выявлено, что у пациентов со среднетяжелой БА без предшествующей терапии ИГСК в период

обострения наблюдались более высокий уровень NO, меньшее содержание альвеолярных макрофагов и большее содержание эозинофилов в ИМ, чем у пациентов, использующих ИГКС.

Приведенные данные свидетельствуют о снижении активности эозинофильного воспаления во время обострения БА на фоне терапии ИГКС. Кроме того, неполный контроль симптомов и тяжелое течение заболевания, по-видимому, ассоциированы с более высоким уровнем метаболитов NO и нейтрофильным компонентом воспаления. С одной стороны, это может быть проявлением продолжающегося воспаления в дыхательных путях. С другой стороны, сохранение нейтрофилии ИМ может быть причиной недостаточной эффективности ИГКС у этих пациентов.

Заключение

Таким образом, такие неинвазивные методики, как исследование клеточного состава индуцированной мокроты и уровней оксида азота в конденсате выдыхаемого воздуха, высокоинформативны не только для диагностики бронхиальной астмы, но и для оценки влияния противовоспалительной терапии. Эти методики исследования могут быть использованы в повседневной практике, они легко применимы и не требуют дорогостоящих оборудования и реактивов.

Литература

1. Авдеев С.И., Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Применение метода индуцированной мокроты для оценки интенсивности воспаления дыхательных путей // Пульмонология. 1998. № 2. С. 81—85.
- 2.

3. Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Исследование конденсата выдыхаемого воздуха в пульмонологии (обзор зарубежной литературы) // Пульмонология. 2002. № 1. С. 57—66.
4. Гельцер Б.И., Петешова Е.А., Кочеткова Е.В., Елисеева Е.В. Определение метаболитов оксида азота в конденсате выдыхаемого воздуха как способ оценки NO-реактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой // Пульмонология. 2003. № 10. С. 91—94.
5. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / Под ред. А.Г. Чучалина. М.: Изд-во «Атмосфера», 2002.
6. Назаретян Э.Е., Нариманян М.З., Мартиросян Т.В., Гаспарян А.Ю. Содержание окиси азота в слюне и легочная гипертензия у больных с различной степенью тяжести бронхиальной астмы // Пульмонология. 2000. № 2. С. 23—27.
7. Невзорова В.А., Майстровская Ю.В., Чкаловец И.В. и др. Исследования содержания метаболитов оксида азота, α₁-кислого гликопротеина и его гликоформ в конденсате выдыхаемого воздуха больных бронхиальной астмой // Пульмонология. 2003. № 6. С. 46—51.
8. Barnes P.J. The effect of drugs on exhaled nitric oxide // ERR. 1999. V. 68. P. 231—233.
9. Barnes P.J., Pedersen S., Busse W.W. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998. V. 157. P. 1—53.
10. Fahy J.V., Boushey H.A. Effect of low-dose beclomethasone dipropionate on asthma control and airway inflammation // ERJ. 1998. V. 11. P. 1240—1247.
11. Ho L.P., Innes J.A., Greening A.P. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide // Thorax. 1998. V. 53. P. 680—684.
12. Holz O., Magnussen H. Update of sputum methodology // ERJ. 2000. V. 16. P. 355—359.
13. Jatakanon A., Kharitonov S.A., Lim S., Barnes P.J. Effect of different doses of inhaled budesonide on markers of airway inflammation in patients with mild asthma // Thorax. 1999. V. 54. P. 108—114.
14. Jayaram L., Parameswaran K., Sears M.R., Hargreave F.E. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice // ERJ. 2000. V. 16. P. 150—158.
15. Kharitonov S.A., Barnes P.J. Exhaled markers of pulmonary disease // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. V. 163. P. 1693—1722.
16. Kharitonov S.A., Wells A.U., O'Connor B.J. et al. Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995. V. 151. P. 1889—1893.
17. Kharitonov S.A., Yates D.H., Chung K.F., Barnes P.J. Changes in the dose of inhaled steroids affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients // ERJ. 1996. V. 9. P. 196—201.
18. Lim S., Chung K.F. Potential role of noninvasive markers of inflammation in clinical management of asthma // ERR. 1998. V. 64. P. 1103—1107.

Поступила в редакцию 01.12.2006 г.