

УДК (615.276:615.015.26-092):611.018.53

## РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ У БОЛЬНЫХ С АСТМАТИЧЕСКОЙ ТРИАДОЙ

© Чаусова С.В.<sup>1</sup>, Гуревич К.Г.<sup>2</sup>, Калиш С.В.<sup>2</sup>, Бондарева Г.П.<sup>1</sup>, Малышев И.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва; <sup>2</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва  
E-mail: [svetlana\\_chau@mail.ru](mailto:svetlana_chau@mail.ru)

Исследовали влияние блокатора индуцибельной NO-синтазы (iNOS) N-нитро-L-аргинина (LNNA) в смеси с нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) на стимулированную сульфатом бария люминолзависимую хемилюминесценцию (СЛХЛ) крови больных с астматической триадой (АТ). Было выявлено, что LNNA в значительной степени снимал вызываемое НПВП угнетение СЛХЛ крови у пациентов с АТ, при этом наибольший эффект наблюдался при высоких концентрациях LNNA. Определяли активность iNOS фагоцитов периферической крови у больных с АТ и здоровых доноров. С помощью реакции Грисса спектрофотометрически оценивалась продукция нитритов фагоцитами в культуральной среде. У всех пациентов с АТ уровень нитритов был выше такового доноров, при этом более высокие концентрации нитритов наблюдались в группе пациентов в стадию обострения хронического бронхита и астмы. Определяли зависимость относительной светосуммы СЛХЛ крови от уровня активности iNOS фагоцитов у больных с АТ. Не выявлено зависимости между степенью угнетения СЛХЛ под влиянием НПВП у больных с непереносимостью данных препаратов и уровнем активности iNOS фагоцитов.

**Ключевые слова:** астматическая триада, хемилюминесценция, оксид азота, индуцибельная NO-синтаза, N-нитро-L-аргинин.

### THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN PATHOGENESIS OF NON STEROID ANTI-INFLAMMATORY DRUG INTOLERANCE AMONG PATIENTS WITH ASTHMATIC TRIAD

Chausova S.V.<sup>1</sup>, Gurevich K.G.<sup>2</sup>, Kalish S.V.<sup>2</sup>, Bondareva G.P.<sup>1</sup>, Malyshev I.Yu.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow;

<sup>2</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow

We have investigated the influence of N-nitro-L - arginine (LNNA) blocker of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the admixture with non -steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on barium sulphate stimulated luminol-depended chemiluminescence (SLCL) in blood of patients with asthmatic triad (AT). It was established that LNNA noticeably remove NSAIDs -induced inhibition of SLCL in blood of patients with AT (high concentrations of LNNA yielded the best effects). iNOS activity of blood phagocytes was detected by registration of synthesized nitric levels. All the patients with AT had high nitric level compared to healthy donors. We have detected the dependence between SLCL levels and iNOS activity levels of blood phagocytes among patients with AT. Among patients with intolerance to NSAIDs, we detected no dependence between inhibition of SLCL by NSAIDs and iNOS activity levels of blood phagocytes.

**Keywords:** asthmatic triad, chemiluminescence, nitric oxide, inducible nitric oxide synthase, N-nitro-L - arginine.

Ранее нами было установлено изменение стимулированной сульфатом бария люминолзависимой хемилюминесценции (СЛХЛ) крови при непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) [13]. Так, добавление салицилата натрия, анальгина или диклофенака натрия к пробам крови пациентов с непереносимостью этих препаратов вызывало угнетение СЛХЛ, которое оказалось дозозависимым. По результатам проведенных исследований был разработан безопасный и экономичный тест *in vitro* для диагностики непереносимости НПВП [13]. Кроме того, проведенные нами исследования показали, что подавление СЛХЛ цельной крови связано с изменением активности НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы ПМЛ при воздействии на кровь больных НПВП [14].

В дальнейшем в ходе экспериментальных исследований [15] нами было выявлено, что показатели стимулированной люминол- и люцигенинзависимой ХЛ выделенных полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЛ) под влиянием салицилата натрия, метамизола натрия, диклофенака натрия не имеют достоверных отличий ( $p > 0,1$ ) у доноров и больных с непереносимостью указанных препаратов, что может свидетельствовать об отсутствии каких-либо особенностей в работе ферментов окислительного метаболизма ПМЛ под воздействием указанных НПВП у больных с непереносимостью данных препаратов по сравнению с донорами. В связи с чем мы полагаем, что различия в показателях СЛХЛ цельной крови больных с непереносимостью НПВП по сравнению с донорами при прединкубации проб крови с НПВП, по-видимому, связаны с влиянием на ферменты

окислительного метаболизма, находящиеся в плазме крови биологически активных веществ (медиаторов), содержание и соотношение которых различно у доноров и больных с непереносимостью НПВП [21]. Установлено, что одним из механизмов угнетения СЛХЛ под влиянием НПВП является гистаминовый механизм [24]. По-видимому, биологически активные вещества, воздействуя на ПМЛ, способны изменять активность ферментов окислительного метаболизма ПМЛ и, следовательно, модифицировать СЛХЛ крови. В частности, при изучении влияния гистамина, используемого в различных концентрациях, на окислительный метаболизм ПМЛ было выявлено, что гистамин дозозависимо изменяет активность НАДФН-оксидазной и миелопероксидазной ферментных систем ПМЛ [4].

В последние годы в литературе большое внимание уделено оксиду азота (NO), являющемуся универсальным регулятором многих физиологических процессов в клетках и организме в целом и функционирующему, как сигнальная молекула межклеточных взаимодействий практически во всех органах и тканях человека и животных [9].

Многочисленными исследованиями установлено, что у больных бронхиальной астмой (БА) в выдыхаемом воздухе выявляется значительное повышение содержания NO по сравнению с таковым у здоровых людей [5,12]. Известно, что повышение уровня NO в выдыхаемом воздухе зависит от наличия воспалительных изменений в бронхах, которые влияют на активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS) [5,9]. iNOS активируется в клетках под действием бактериальных липополисахаридов, эндотоксинов, а также провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1 $\beta$ , интерферон- $\gamma$ , фактор некроза опухоли [9]. В клетках, находящихся в покое, она не определяется. Она образует и обеспечивает длительное выделение NO активированными макрофагами, нейтрофилами, сосудистым эндотелием, микроглиальными клетками, астроцитами и др. Продуктируемый iNOS NO, прежде всего, предназначен для защиты организма хозяина, способствует снижению активности пограничных воспалительных клеток, гибели микроорганизмов и внутриклеточных паразитов, опухолевых клеток и др. эффекты [9]. Кроме того, при определенных условиях (слишком высоких тканевых концентрациях) NO способен усиливать развитие ряда патологических процессов. Согласно современным представлениям, они обусловлены образованием сильнейшего окислительного агента – пероксинитрита, возникающего в реакции NO с анионом супероксида (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) [2].

При обострении БА имеется параллельное увеличение количества выдыхаемого NO и актив-

ности iNOS [5]. Кроме того, A. Parikh et al. [23] в своих исследованиях определили более высокий уровень активности iNOS в эпителии носовых полипов у пациентов с астматической триадой (АТ) (БА, полипозный риносинусит, непереносимость НПВП) по сравнению с таковым у пациентов с полипозом носа и БА без непереносимости аспирина.

Между тем до настоящего времени неизвестно, существует ли зависимость между степенью подавления СЛХЛ крови под влиянием НПВП у больных с АТ и уровнем активности iNOS. Для получения ответа на данный вопрос было проведено настоящее исследование.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе представлены 3 серии опытов.

В первой серии опытов объектом исследования были 14 больных (7 женщин и 5 мужчин) с АТ со смешанной (неинфекционно- и инфекционно-зависимой) и инфекционно-зависимой формами БА в возрасте от 19 до 70 лет. Из этих больных 8 человек находились в стадии обострения хронического бронхита и БА, 6 человек – в стадии медикаментозной ремиссии. Критерии включения пациентов в исследование: приступы экспираторного диспноэ на прием аспирина и/или анальгина в любой лекарственной форме (инъекции, таблетки, драже). Критерии исключения пациентов из исследования: прием антигистаминных препаратов, НПВП за 2 недели и менее до исследования. Контрольная группа практически здоровых людей состояла из 10 человек (6 женщин и 4 мужчин) в том же возрастном диапазоне, не принимавших НПВП и антигистаминные препараты в ближайшие 2 недели до эксперимента.

Во второй серии опытов объектом исследования были 18 больных (11 женщин и 7 мужчин) с БА смешанной (неинфекционно- и инфекционно-зависимой) и инфекционно-зависимой формами в возрасте от 19 до 68 лет. Из этих больных 13 человек имели АТ, при этом 7 пациентов находились в стадии медикаментозной ремиссии хронического бронхита и астмы, 6 пациентов – в стадии обострения хронического бронхита и БА. 5 пациентов имели атопическую форму БА в стадию ремиссии без полипоза носа и непереносимости НПВП. Критерии включения и исключения пациентов аналогичны вышеописанным. Контрольная группа практически здоровых людей состояла из 5 человек (3 женщин и 2 мужчин) в том же возрастном диапазоне, не имеющих воспалительных процессов в организме и не принимавших НПВП в ближайшие 2 недели до эксперимента.

В третьей серии опытов объектом исследования были 65 человек с АТ со смешанной (неинфекционно- и инфекционно-зависимой) и инфекционно-зависимой формами БА+. Из них 37 человек находились в фазе обострения хронического бронхита и БА, 28 человек – в фазе ремиссии. У 21 больного по данным анамнеза была непереносимость аспирина, у 26 – непереносимость анальгина, у 18 – непереносимость диклофенака натрия. Критерии включения и исключения пациентов аналогичны вышеописанным.

Для исследования использовали гепаринизированную венозную кровь объемом 4,5 мл (концентрация гепарина – 50 ЕД/мл). Непосредственно перед проведением исследования производили подсчет лейкоцитарной формулы крови с определением количества и жизнеспособности ПМЛ.

Клиническое исследование одобрено Межвузовским Комитетом по этике, протокол № 05-12 от 17.05.2012 г. Все пациенты дали письменное информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

*Инкубация образцов крови с исследуемыми препаратами.*

В зависимости от поставленных нами задач производили:

1. Прединкубацию гепаринизированной венозной крови больных АТ с непереносимостью аспирина и/или анальгина и/ или диклофенака с салицилатом натрия, метамизолом натрия или диклофенаком натрия в конечных концентрациях 3,0 мМ, 6 мкМ, 6 мкМ соответственно.

Указанные концентрации данных НПВП были выбраны потому, что на этих концентрациях в проведенных ранее нами исследованиях выявлялись наибольшие различия показателей СЛХЛ между здоровыми донорами и больными с непереносимостью НПВП [13]. Салицилат натрия (порошок, Екатеринбургская фарм. фабрика, Россия) и метамизол натрия (порошок, Медокеми ЛТД, Кипр) растворяли в физиологическом растворе, диклофенак натрия (порошок, Фармстандарт, Россия) – в воде для инъекций. В контрольные пробы вместо используемых препаратов добавляли физиологический раствор или воду для инъекций в том же объеме. Каждую пробу инкубировали в течение 45 мин. при 37°C при постоянном перемешивании.

2. Прединкубацию гепаринизированной венозной крови больных АТ с блокатором индуцибельной NO-синтазы N-нитро-L-аргинином в конечных концентрациях от 0,046 мкМ до 45,7 мкМ в течение 15 минут при 37°C при постоянном перемешивании. Затем в пробу вносили НПВП, после чего инкубировали еще 45 минут в тех же условиях. N-нитро-L-аргинин (порошок, SIGMA, США) растворяли в воде для инъекций. К кон-

трольным пробам добавляли раствор N нитро-L-аргинина в том же объеме.

*Метод определения люминолзависимой хемилюминесценции крови.*

Из образцов крови отбирали объемы, содержащие  $1 \times 10^6$  лейкоцитов, и доводили их до 0,69 мл средой Хенкса. К полученным образцам добавляли 0,01 мл растворов исследуемых препаратов. Каждую пробу инкубировали в течение 45-60 мин. при 37°C при постоянном перемешивании. Жизнеспособность ПМЛ, определяемая окрашиванием трипановым синим, за время инкубации существенно не изменялась. После инкубации проводили измерение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) проб на 36-кюветном биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ 3606-01 (г. Красноярск), сигнал от которого поступал на персональный компьютер и анализировался с помощью программы VLM-Obrab. В качестве активатора свечения использовали люминол (регистрирует суммарную продукцию активных форм кислорода (АФК) ПМЛ) [1]. В кювету хемилюминометра вносили 0,7 мл пробы после инкубации и 0,15 мл активатора (2 мМ). Далее измеряли уровень спонтанной ХЛ. После регистрации спонтанной ХЛ добавляли 0,15 мл стимулятора свечения – сульфата бария (2мг/мл) и регистрировали уровень стимулированной ХЛ. Измерение ХЛ крови проводили в режиме постоянного перемешивания при температуре 37°C.

С помощью компьютерной программы VLM-Obrab определяли площадь под кривой ХЛ, отражающую светосумму ХЛ. При оценке влияния N-нитро-L-аргинина и/или НПВП на ХЛ ПМЛ рассчитывали относительную светосумму свечения, как отношение светосумм свечения опытной и контрольной проб.

*Метод культивирования суспензии лейкоцитов.*

Для исследования использовали суспензию лейкоцитов, выделенных из гепаринизированной венозной крови, объемом 4,5 мл (концентрация гепарина – 50 ЕД/мл). Для выделения лейкоцитов из периферической крови использовали метод спонтанного осаждения [8]. Лейкоциты в стандартной питательной среде RPMI 1640 в стерильных условиях помещали в лунки стерильных культуральных планшетов из расчета  $0,5 \times 10^6$  лейкоцитов на 1 лунку 48-луночного планшета. Планшет с лейкоцитами помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор (содержание CO<sub>2</sub> составляло 5%) и инкубировали в течение часа при 37°C. После инкубации питательная среда из всех лунок с клетками отбиралась и заменялась на следующую инкубационную смесь: 0,5 мл питательной среды + сыворотка (FBS, 10%) + антибиотик (пенициллин / стрептомицин, 100 ед/мл / 100 мкг/мл).

Затем в опытные пробы вносили 0,01 мл раствора салицилата натрия, метамизола натрия или диклофенака натрия в конечных концентрациях 1,5 мМ, 3 мкМ, 3 мкМ соответственно. В контрольные пробы вместо указанных препаратов добавляли физиологический раствор или воду для инъекций в том же объеме. После этого планшет с лейкоцитами вновь помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор и инкубировали в течение часа при 37°C. После инкубации в каждую лунку вносили 10 мкл стимулятора- сульфата бария (рабочая концентрация 2 мг/мл), после чего планшет снова помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор и инкубировали в течение 18 часов в тех же условиях.

*Метод определения нитритов в культуральной среде.*

Учитывая, что нитрит ион крайне нестабилен и быстро переходит в нитрат ион под действием АФК ПМЛ, активированных сульфатом бария, для количественного определения уровней нитритов предварительно проводилась обработка проб с помощью кадмиевых редукторов. Затем с помощью реакции Грисса спектрофотометрически оценивалась продукция нитритов лейкоцитами в культуральной среде по стандартной методике [27].

*Статистическая обработка результатов.*

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программ «STATISTICA» версия 7.0 и Excel 2007. Все результаты в данной работе представляли в виде  $M \pm m$  ( $M$  – среднее арифметическое для анализируемой группы показателей,  $m$  – ошибка среднего). Соответствие закона распределения нормальному устанавливали с помощью  $\lambda$ -критерия Колмогорова-Смирнова. Статистическую достовер-

ность отличия измеряемых величин определяли, используя критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверно значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии опытов исследовали влияние блокатора индуцибельной NO-синтазы N-нитро-L-аргинина на СЛХЛ крови больных с АТ.

Опытные пробы инкубировали с раствором N-нитро-L-аргинина в различных концентрациях в смеси с салицилатом или метамизолом натрия. Поскольку проведенные нами предварительные исследования не выявили достоверных различий показателей СЛХЛ крови под влиянием N-нитро-L-аргинина в смеси с НПВП у пациентов с АТ в фазу обострения и в фазу медикаментозной ремиссии хронического бронхита, всех пациентов с АТ мы объединили в одну группу. Результаты представлены в табл. 1.

Как видно из данных таблицы, блокатор iNOS N-нитро-L-аргинин в значительной степени снимает вызываемое НПВП угнетение СЛХЛ крови у пациентов с АТ, при этом наибольший эффект наблюдался при высоких концентрациях N-нитро-L-аргинина. Уменьшение ингибирующего действия НПВП на СЛХЛ крови под влиянием N-нитро-L-аргинина у больных с непереносимостью соответствующих препаратов может происходить, во-первых, из-за снижения образования NO, который подавляет активность НАДФН-оксидазы ПМЛ, эффективно взаимодействует с O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, в результате чего снижается продукция H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и OH<sup>•</sup> [10]; во-вторых, из-за возможного участия iNOS в механизмах угнетения СЛХЛ крови под влиянием НПВП у больных с АТ.

Таблица 1

Влияние N-нитро-L-аргинина в смеси с салицилатом или метамизолом натрия на стимулированную сульфатом бария люминолзависимую ХЛ крови больных с астматической триадой

Концентрации исследуемых препаратов	Относительная светосумма СЛХЛ, отн.ед.
N-нитро-L-аргинин (22,8 мкМ) + салицилат натрия 3 мМ	1,16±0,10*
N-нитро-L-аргинин (11,4 мкМ) + салицилат натрия 3 мМ	1,14±0,07*
N-нитро-L-аргинин (2,3 мкМ) + салицилат натрия 3 мМ	1,02±0,06*
N-нитро-L-аргинин (0,46 мкМ) + салицилат натрия 3 мМ	0,96±0,09*
N-нитро-L-аргинин (0,05 мкМ) + салицилат натрия 3 мМ	0,90±0,04*
N-нитро-L-аргинин (0,02 мкМ) + салицилат натрия 3 мМ	0,84±0,03*
Салицилат натрия 3 мМ	0,66±0,05
N-нитро-L-аргинин (22,8 мкМ) + метамизол натрия 6 мкМ	1,11±0,13*
N-нитро-L-аргинин (11,4 мкМ) + метамизол натрия 6 мкМ	1,02±0,06*
N-нитро-L-аргинин (2,3 мкМ) + метамизол натрия 6 мкМ	0,94±0,09*
N-нитро-L-аргинин (0,46 мкМ) + метамизол натрия 6 мкМ	0,93±0,06*
N-нитро-L-аргинин (0,05 мкМ) + метамизол натрия 6 мкМ	0,85±0,05*
N-нитро-L-аргинин (0,02 мкМ) + метамизол натрия 6 мкМ	0,75±0,01*
Метамизол натрия 6 мкМ	0,63±0,03

Примечание: \* –  $p < 0,05$  относительно показателей СЛХЛ проб крови с салицилатом или метамизолом натрия.

Таблица 2

Влияние салицилата, метамизола и диклофенака натрия на уровень нитритов у пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров

Препарат	Здоровые доноры	Атопическая БА в фазу ремиссии	АТ в фазу ремиссии	АТ в фазу обострения
Контроль (без НПВП)	79,81±6,38	106,77±11,74	130,15±10,41*	169,34±14,61*
Салицилат натрия	64,65±5,82 (↓ на 19% отн. контроля)	84,34±7,59 (↓ на 21% отн. контроля)	104,12±13,55* (↓ на 20% отн. контроля)	133,11±13,41* (↓ на 18% отн. контроля)
Метамизол натрия	60,67±6,07 (↓ на 24% отн. контроля)	82,21±9,04 (↓ на 23% отн. контроля)	101,51±8,12* (↓ на 22% отн. контроля)	129,88± 11,69* (↓ на 20% отн. контроля)
Диклофенак натрия	65,45±5,89 (↓ 18% отн. контроля)	86,48±8,55 (↓ на 19% отн. контроля)	108,02±9,72* (↓ на 17% отн. контроля)	136,36±10,91* (↓ на 16% отн. контроля)

Примечание: \* –  $p < 0,05$  относительно показателей проб здоровых доноров.

Таблица 3

Зависимость относительной светосуммы СЛХЛ крови от фазы течения хронического бронхита у больных с астматической триадой

НПВП	Относительная светосумма СЛХЛ		
	Фаза обострения хронического бронхита и астмы	Фаза ремиссии хронического бронхита и астмы	Здоровые доноры
Салицилат натрия	0,69±0,05	0,67±0,05	1,09±0,09
Метамизол натрия	0,74±0,03	0,75±0,04	1,17±0,08
Диклофенак натрия	0,89±0,05	0,93±0,03	1,78±0,17

Поэтому ингибирование продукции NO может приводить к увеличению СЛХЛ крови, несмотря на снижение продукции пероксинитрита, способного окислять люминол и вносить вклад в развитие люминолзависимой ХЛ фагоцитов [22]. Однако при воспалении на первый план выходят реакции, связанные с активацией фагоцитов и образованием ими АФК ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$ ,  $ClO^{\cdot}$ ), а затем – перекисей липидов, в то время как в норме за свечение клеток в значительной степени ответственны реакции оксида азота [17].

Для выяснения вопроса участия iNOS в механизмах угнетения СЛХЛ крови под влиянием НПВП у больных с АТ были проведены следующие исследования.

Во второй серии экспериментов определяли активность iNOS лейкоцитов периферической крови у больных с БА и здоровых доноров при воздействии на культуру лейкоцитов исследуемых НПВП. Результаты представлены в табл. 2.

Как видно из данных таблицы уровень нитритов в контрольных пробах (без НПВП) различен у всех исследуемых групп лиц. Самый низкий уровень нитритов был в группе здоровых доноров. В группе пациентов с атопической формой БА без полипозного риносинусита и непереносимости НПВП в период ремиссии уровень нитритов не

имел достоверных отличий от такового здоровых доноров. У всех пациентов с АТ уровень нитритов был достоверно выше такового здоровых доноров. При этом, при сравнении уровня нитритов у пациентов с АТ и атопической формой БА без полипоза носа и непереносимости НПВП, содержание нитритов было достоверно выше в группе пациентов с АТ в фазу обострения хронического бронхита и БА. При сравнении концентрации нитритов в группах пациентов с АТ в разные фазы течения хронического бронхита уровень нитритов был достоверно выше у пациентов с АТ в фазу обострения хронического бронхита и БА по сравнению с группой пациентов с АТ в фазу ремиссии. Кроме того, прединкубация суспензии лейкоцитов с НПВП сопровождалась тенденцией к снижению уровня нитритов у всех исследуемых групп лиц. Следует отметить, что степень подавления продукции нитритов фагоцитами под влиянием НПВП существенно не различалась у всех исследуемых групп лиц. Из этого следует, что уровень активности iNOS фагоцитов изменяется сходным образом под влиянием НПВП у здоровых доноров и у всех пациентов с БА вне зависимости от фазы течения заболевания и наличия непереносимости НПВП.

Ингибирующее действие НПВП на продукцию нитритов активированными фагоцитами может быть связано с тем, что НПВП подавляют синтез мРНК iNOS [3, 25], а также ингибируют образование провоспалительных цитокинов, стимулирующих активность iNOS [19, 26].

Также можно заключить, что одной из причин установленного ранее нами снижения суммарной продукции АФК, а также продукции  $O_2^{\bullet}$  ПМЛ у пациентов с АТ [16] является повышение активности iNOS ПМЛ, в результате чего образующийся в большом количестве NO угнетает активность НАДФН-оксидазы и образование  $H_2O_2$  и  $OH^{\bullet}$  [10], что сопровождается подавлением люминол-зависимой ХЛ крови. Кроме того, под действием NO происходит снижение люцигенинзависимой ХЛ (отражает образование  $O_2^{\bullet}$ ) в результате прямого связывания NO супероксидными радикалами, образуемыми в митохондриях [7].

Учитывая, что активность iNOS фагоцитов несколько выше у пациентов с обострением воспалительного процесса в бронхах по сравнению с таковыми в ремиссии, мы посчитали целесообразным сравнить показатели относительной светосуммы СЛХЛ у пациентов с АТ в фазу обострения хронического бронхита и БА по сравнению с пациентами в фазу ремиссии. Для наглядности приведены значения относительной интенсивности СЛХЛ здоровых доноров [13]. Результаты представлены в табл. 3.

Из данных таблицы видно, что отсутствует зависимость относительной светосуммы СЛХЛ от фазы течения воспалительного процесса в бронхах и, следовательно, от уровня активности iNOS фагоцитов.

Таким образом, мы склонны полагать, что ингибирование СЛХЛ крови под влиянием НПВП у больных с АТ, имеющих непереносимость соответствующих НПВП, не связано с повышением активности iNOS фагоцитов.

Однако при обострении БА имеется параллельное увеличение количества выдыхаемого NO, активности iNOS, а также высокотоксичного пероксинитрита [5]. При воспалении происходит избыточное накопление NO в результате активации iNOS. Это в свою очередь приводит к увеличению продуктов метаболизма NO – сильнейших оксидантов – пероксинитритного аниона, пероксинитритной кислоты, приводящих к образованию  $OH^{\bullet}$ , инициирующего процесс перекисного окисления клеточных мембран. У больных БА накопление токсичных свободных радикалов приводит к усугублению процесса воспаления дыхательных путей за счет увеличения сосудистой проницаемости, появления воспалительного отека [5]. Следует отметить, что благоприятные условия для усиления свободнорадикальных про-

цессов и готовность к обострению воспаления создает также первичное угнетение антиоксидантной системы у больных с АТ, в частности, снижение активности внутриклеточных антиоксидантных металлоэнзимов (супероксиддисмутазы и каталазы), что особенно выражено в фазу обострения процесса [11]. Кроме того, высокие концентрации NO в эпителиальных или воспалительных клетках, образующиеся под воздействием цитокинов или эндотоксинов, могут подавлять активность конститутивной NO-синтазы (kNOS) и угнетать активность растворимой гуанилатциклазы, что приводит к уменьшению продукции циклического гуанозинмонофосфата, увеличению содержания внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и в конечном счете к бронхоспазму [5]. Таким образом, NO, произведенный в физиологических количествах kNOS, направлен на поддержание определенного тканевого равновесия, в то время как NO, являющийся продуктом iNOS, усиливает воспалительные изменения в дыхательных путях при БА и, следовательно, повышает гиперреактивность бронхов [18]. Поэтому, очевидно, что повышение активности iNOS эпителиальных клеток и фагоцитов связано с выраженностью клинических проявлений бронхиальной астмы. Значительное возрастание активности iNOS в фазу обострения хронического бронхита у больных с АТ способствует повышению гиперреактивности бронхов, что сопровождается увеличением тяжести приступов экспираторного диспноэ на любые специфические и неспецифические раздражители, в том числе НПВП.

Таким образом, активность индуцибельной NO-синтазы фагоцитов повышена у больных с астматической триадой. В стадию обострения хронического бронхита и астмы активность индуцибельной NO-синтазы выше, чем в стадию ремиссии.

С увеличением активности индуцибельной NO-синтазы фагоцитов связано снижение суммарной продукции АФК ПМЛ, а также продукции супероксидного анион-радикала ПМЛ крови больных с астматической триадой.

Возрастание активности индуцибельной NO-синтазы фагоцитов в фазу обострения хронического бронхита у больных с астматической триадой способствует увеличению тяжести приступов экспираторного диспноэ на любые специфические и неспецифические раздражители, в том числе НПВП.

Не выявлено зависимости между степенью угнетения СЛХЛ крови под влиянием НПВП у больных с непереносимостью данных препаратов и уровнем активности индуцибельной NO-синтазы фагоцитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В.* Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
2. *Ванин А.Ф.* Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 867-869
3. *Дубиков А.И.* Нестероидные противовоспалительные средства: некоторые практические аспекты применения // Неврология. – 2009. – № 1. – С. 13-18
4. *Искусных А.Ю., Башарина О.В., Артюхов В.Г., Алабовский В.В.* Влияние гистамина на функциональные свойства нейтрофилов и интенсивность процесса пероксидного окисления нейтрофилов в крови доноров // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2008. – № 1. – С. 93-96.
5. *Лев Н.С.* Патогенетическая роль оксида азота при бронхиальной астме // Рос. вестник перинатологии и педиатрии. – 2000. – № 4. – С. 48-51.
6. *Литвинова Н.В., Курапова Т.Н.* Нестероидные противовоспалительные средства: возможные механизмы антиоксидантного действия // Биополимеры. – 2004. – Т. 20, № 6. – С. 472-478.
7. *Матвеева Н.С., Любицкий О.Б., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А.* Активированная люцигенином хемилюминесценция тканей животных // Биофизика. – 2007. – Т. 52, № 6. – С. 1120-1127.
8. *Мельников О.Ф.* Способ выделения лейкоцитов из периферической крови // Лаб. дело. – 1985. – № 10. – С. 632-633.
9. *Паришина С.С.* Современные представления о биологических эффектах оксида азота и его роли в развитии кардиоваскулярной патологии // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 88-94.
10. *Солодовникова О.Н., Молочный В.П.* «Кислородный взрыв» нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе воспалительной реакции при гнойных инфекциях у детей // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 118-122.
11. *Солонго Б., Сизих Т.П., Чхенкели В.А., Растомпахова Т.А.* Состояние антиоксидантной системы у больных бронхиальной астмой разными формами // Сиб. мед. журн.(Иркутск) – 2004. – Т. 43, № 2. – С. 40-44.
12. *Цыпленкова С.Э., Мизерницкий Ю.Л.* Оксид азота в выдыхаемом воздухе: клинико-функциональные параллели при бронхиальной астме у детей // Аллергология. – 2006. – № 2. – С. 48-53.
13. *Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Бондарева Г.П., Филатов О.Ю., Мальшев И.Ю.* Возможность диагностики непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов по изменению хемилюминесцентного свечения полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2014. – № 4. – С. 127-132.
14. *Чаусова С.В., Бондарева Г.П., Усанова Е.А., Евстратова В.С., Мальшев И.Ю., Дмитриева Е.А.* Влияние диклофенака натрия на оксидантные функции полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров и больных с повышенной чувствительностью к диклофенаку // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 1. – С. 73-76.
15. *Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Усанова Е.А., Арутюнова Е.А., Балякин Ю.В., Мальшев И.Ю.* Влияние нестероидных противовоспалительных препаратов на хемилюминесценцию полиморфноядерных лейкоцитов у пациентов с непереносимостью данных препаратов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77(5). – С. 28-31.
16. *Чаусова С.В., Бондарева Г.П., Усанова Е.А., Синельникова А.Н., Гуревич К.Г.* Изменение функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови у больных с астматической триадой // Медицина критических состояний. – 2014. – № 2. – С. 30-35.
17. *Шерстнев М.П.* Роль нарушения барьерной и матричной функции липидного слоя биологических мембран в патологии // Вопросы хемилюминесценции. – 1990. – № 1. – С. 19-20.
18. *Barnes P.G.* NO or no NO in asthma? // Torax. – 1996. – N 51. – P. 218-220.
19. *Inaoka M., Kimishima M., Takahashi R., Shiohara T.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs selectively inhibit cytokine production by NK cells and gamma delta T cells // Exp Dermatol. – 2006. – Vol. 15, N 12. – P. 981-990.
20. *Kitsis E.A., Weissmann G., Abramson S.B.* The prostaglandin paradox: additive inhibition of neutrophil function by aspirin-like drugs and the prostaglandin E1 analog misoprostol // J. Rheumatol. – 1991. – V. 18, N 10. – P. 1461-1465.
21. *Kowalski M.L., Makowska J.S.* Аспиринзависимые заболевания органов дыхания. Современные подходы к диагностике и лечению // Allergy Clin. Immunol. Int. J. World Allergy Org. Russ. Ed. – 2007. – Vol. 2, N 1. – P. 12-22.
22. *Kudoh S., Suzuki K., Yamada M., Liu Q., Nakaji S., Sugawara K.* Contribution of nitric oxide synthase to human neutrophil chemiluminescence // Luminescence. – 1999. – Vol. 14, N 6. – P. 335-339.
23. *Parikh A., Scadding G.K., Gray P., Belvisi M.G., Mitchell J.A.* High levels of nitric oxide synthase activity are associated with nasal polyp tissue from aspirin-sensitive asthmatics // Acta Otolaryngol. – 2002. – Vol. 122, N 3. – P. 302-305.
24. *Pytsky V.I., Filatov O.Ju., Chausova S.V.* Role of histamine in inhibition of stimulated luminol-dependent chemiluminescence of blood leucocytes induced by salicylate sodium or metamizole sodium (analgin) in aspirin or/and analgin sensitive patients // Eur. J. of Clin. Chem. & Clin. Biochem. – 1997. – Vol. 35, N 9. – P. 94.
25. *Stratman N.C., Carter D.B., Sethy V.H.* Ibuprofen: effect on inducible nitric oxide synthase // Brain Res Mol Brain Res. – 1997. – Vol. 50, N 1-2. – P. 107-112.
26. *Teeling J.L., Cunningham C., Newman T.A., Perry V.H.* The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications

- for a role of COX-1 // *Brain Behav Immun.* – 2010. – Vol. 24, N 3. – P. 409-419.
27. *Redente E.F., Dwyer-Nield L.D., Barrett B.S., Riches D.W., Malkinson A.M.* Lung tumor growth

is stimulated in IFN- $\gamma$   $-/-$  mice and inhibited in IL-4-R $\alpha$   $-/-$  mice // *Anticancer Research.* – 2009. – Vol. 29, N 12. – P. 5095-5101.