

Е.И. Асташкин¹, А.В. Широкая², Н.Д. Егорова¹,
Н.С. Орехова¹, А.Н. Новикова¹, А.Н. Наседкин², С.В. Грачев¹

Патофизиологические механизмы влияния экзогенного монооксида азота при полипозном риносинусите

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, 129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2

При помощи метода хемилюминесценции произведена оценка функциональной активности функционального состояния фагоцитов крови больных полипозным риносинуситом. При этом оценивалась способность фагоцитов генерировать супероксид анион. Показано изменение ответа клеток первичного иммунитета на стандартный активатор (формил пептид) при воздействии на полость носа оксидом азота. Исследование проведено в динамике.

Ключевые слова: полипозный риносинусит, фагоциты крови, супероксид анион, оксид азота, формил пептид

E.I. Astashkin, A.V. Shirokaya, N.D. Yegorova,
N.S. Orekhova, A.N. Novikova, A.N. Nasedkin, S.V. Grachev

Pathophysiological mechanisms of influence of exogenous nitrogen monoxide polypous rhinosinuitis

By using the chemiluminescence method to evaluate the functional activity of the functional state of phagocytes blood patients with polypous rhinosinuitis. It was evaluated the ability of phagocytes generate superoxide anion. e monstrates how to change the primary immune cells respond to standard activator (formil peptide) when exposed to the nasal cavity nitrogen oxide. The research was performed in dynamics.

Key words: polypous rhinosinuitis, blood phagocytes, superoxide anion, nitric oxide, formil peptide

Полипозный риносинусит (ПР) относится к числу наиболее распространенных хронических заболеваний носа и околоносовых пазух (ОНП). Это заболевание снижает качество жизни пациентов, их трудоспособность, что приводит к высокому экономическому ущербу и является важной медико-биологической проблемой. В последние годы наблюдается неуклонный рост количества пациентов с этим диагнозом [3, 4]. Важная роль в развитии ПР наряду с аллергическими процессами связана с воздействием бактерий, грибов, вирусов и их ассоциаций на слизистую оболочку носа и ОНП. При изучении их микробного состава у пациентов с ПР наиболее часто выявляют грамотрицательные бактерии (нейсерии, энтеробактерии, в том числе кишечная палочка, и др.). Известно, что грамотрицательные бактерии содержат в клеточной стенке большое количество липополисахарида (ЛПС), который защищает мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды. ЛПС является одним из сильней-

ших активаторов провоспалительных клеток. При его действии на фагоциты человека (нейтрофилы, моноциты, макрофаги) происходит секреция воспалительных цитокинов (TNF- α ; IL-1 и др.). Другой бактериальный продукт — трипептид формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) также выступает в качестве эффективного стимулятора фагоцитов и обладает свойствами хемоаттрактанта. Формил пептид взаимодействует на поверхности фагоцитов со специфическими рецепторами и активирует мембранный фермент — фосфолипазу C, который гидролизует фосфотидил инозитольные фосфолипиды, что приводит к образованию двух вторичных мессенджеров: инозитол-трисфосфата (IP₃) и диацилглицерина (DAG). IP₃ вызывает выход Ca²⁺ из внутриклеточного кальциевого депо, а DAG стимулирует протеинкиназу C (PKC). Эти два процесса приводят к самосборке на плазматической мембране NADPH-оксидазного комплекса, увеличение активности которого сопровождается образованием большого количества супероксид анионов (O₂^{-•}). В результате одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода (O₂) в клетках образуется O₂^{-•} [1, 2, 5, 7, 8, 11, 14].

Для корреспонденции: Широкая Анна Вадимовна, аспирант ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.В. Владимирского.
E-mail: 6018637@mail.ru

В ответ на некротическую гибель клеток, в слизистой оболочке носа и ОНП при ПР, происходит выход фагоцитов крови (прежде всего нейтрофилов, а затем моноцитов) из кровеносных сосудов в пораженную ткань, где они активируются и продуцируют радикалы кислорода. Как известно, фагоциты крови могут существовать в трех состояниях: неактивном, преактивированном (праймированном) и активном. Преактивированные фагоциты не способны секретировать в крови большое количество радикалов кислорода и других биологически активных веществ, но быстро увеличивают уровень $O_2^{\cdot-}$ при последующем действии стимулирующего агента.

Одним из факторов септического воспаления являются молекулы оксида азота (NO). Считается, что наличие высоких концентраций NO в ОНП выступает в качестве условия ее стерильности. В то же время, физиологический уровень NO вызывает вазодилатацию микрососудов, а также способствует нормальной активности мерцательного эпителия. При уменьшении концентрации NO происходит замедление частоты биения ресничек мерцательного эпителия и, как следствие, изменение мукоцилиарного транспорта. При низком уровне NO происходит нарушение функциональной активности мерцательного эпителия, что является ключевым в патогенезе ПР [10]. Взаимодействие NO с $O_2^{\cdot-}$ приводит к образованию пероксинитрита ($NOOO^{\cdot-}$) и снижению уровня NO. Экспериментально показано, что при ПР уровень эндогенного NO в полости носа ниже, чем у здоровых. По мнению ряда авторов, эффективное лечение больных ПР связано с повышением уровня эндогенного NO в полости носа [6, 9, 12, 13].

Цель работы — изучение функционального состояния фагоцитов крови при действии экзогенного оксида азота у пациентов с полипозным риносинуситом.

Методика

Материалом для исследования служила цельная кровь семи больных полипозным риносинуситом. Из них 1 женщина и 6 мужчин. Возраст больных составил 55 ± 10 лет. Для проведения NO-терапии использовали газовый поток экзогенного оксида азота, получаемый при пропускании атмосферного воздуха через универсальный отечественный аппарат для хирургии и NO-терапии «Скальпель-коагулятор-стимулятор «ПЛАЗОН» (образующий NO из атмосферного воздуха). Всем пациентам проводили NO-терапию ежедневно в течение 5 сут. как до, так и после хирургического вмешательства (эндоскопическая двусторонняя гайморэтомидотомия). Сеансы проводили после туалета носа с экспозицией по 1 мин в каждую его половину. Расстояние от наконечника ПЛАЗОН-а до преддверия полости носа составляло

2 см. Использовали минимальный расход воздуха для избегания негативных ощущений у пациента. В послеоперационном периоде применяли традиционную схему лечения: антибактериальная терапия, туалет полости носа, промывание околоносовых синусов физиологическим раствором.

Для оценки функциональной активности фагоцитов крови использовали их способность генерировать $O_2^{\cdot-}$. У каждого пациента полипозным риносинуситом проводили забор венозной крови непосредственно перед измерением $O_2^{\cdot-}$. Объем одной пробы для измерения $O_2^{\cdot-}$ был равен 50—100 мкл. Супероксид анион регистрировали с помощью метода хемилюминесценции (ХЛ) люцигенина (конечная концентрация 20 мкМ) на отечественном хемилюминометре «Биотокс-7». Результаты выражали в количестве импульсов в секунду. В качестве стандартного активатора фагоцитов крови использовали fMLP фирмы «Sigma».

Измерения ХЛ проводились при поступлении в стационар (исходный уровень), после пяти сеансов NO-терапии (перед операцией) и на пятые сутки послеоперационного периода и проводимого в послеоперационном периоде лечения (в том числе и пяти сеансов NO-терапии). Для изучения отдаленных результатов, аналогичное исследование проводили через 6 мес. после окончания курса лечения.

Дополнительно исследовали бактериальную обсемененность слизистой оболочки носа. Для этого изучали мазки, взятые у больных полипозным риносинуситом при поступлении в стационар и на пятые сутки после операции и проведения лечения в послеоперационном периоде. Первичный посев проб клинического материала осуществляли количественным методом на плотные питательные среды. Идентификацию выделенных чистых культур осуществляли общепринятыми методами.

Результаты и обсуждение

Установлено, что характерным признаком фагоцитов крови, у пациентов с полипозным риносинуситом, является их исходная преактивация (праймирование). Об этом свидетельствует монотонное возрастание базального уровня, наблюдаемое при взаимодействии фагоцитов крови со стенкой кюветы, а также последующий высокоамплитудный ответ на стандартный активатор фагоцитов. Последующая добавка fMLP (1 мкМ) вызывала увеличение образования $O_2^{\cdot-}$ (рис. 1).

После проведения NO-терапии отмечали усиление преактивации фагоцитов крови (уровень спонтанного образования $O_2^{\cdot-}$ был примерно в 4 раза выше). Ответ на стандартный активатор (fMLP, 1 мкМ) усиливался и сохранялся на высоком уровне в течение последующих 30 мин регистрации исследования (рис. 2).

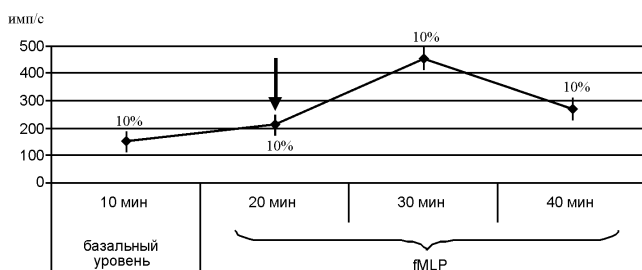


Рис. 1. Динамика изменения базального уровня образования O_2^- в пробах цельной крови пациентов с полипозным риносинуситом и их ответ на fMLP — формил пептид (1 мкМ, стрелкой показана добавка fMLP). Пациенты до лечения

После проведения операции и дополнительного курса NO-терапии наблюдалась следующая картина: базальный уровень O_2^- был исходно высоким и тенденция к его возрастанию сохранялась в течение последующего времени регистрации (клетки были праймированными). Однако, ответ на активатор (fMLP) сохранялся и увеличивался во времени. Ответ на активирующий агент был достоверно более высоким по сравнению с базальным уровнем (рис. 3).

В качестве рабочей гипотезы было выдвинуто предположение о том, что такая картина ответа фагоцитов крови на стандартный активатор вызывает снижение количества NO, образующегося в результате воздействия экзогенного NO после операции на слизистую оболочку полости носа.

Определение генерации O_2^- фагоцитами крови через 6 мес. выявило следующую картину: резко увеличился исходный базальный уровень O_2^- , этот уровень продолжал расти в течение всего периода измерения, а fMLP стимулировал дополнительное образование O_2^- во времени (рис. 4).

Как следует из полученных результатов, исходный уровень активности фагоцитов крови у пациентов с ПР был снижен по сравнению с кровью доноров. В результате воздействия экзогенным NO происхо-

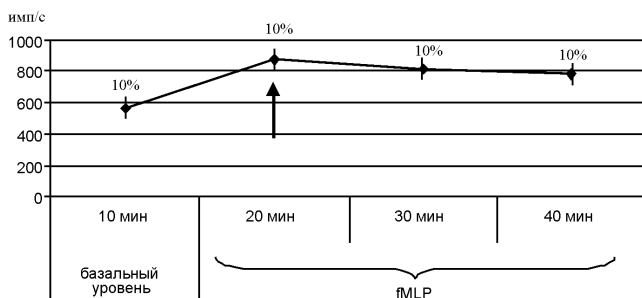


Рис. 3. Динамика изменения базального уровня образования O_2^- в пробах цельной крови пациентов с полипозным риносинуситом и их ответ на fMLP — формил пептид (1 мкМ, стрелкой показана добавка fMLP). После операции и пяти сеансов NO-терапии (1 сеанс в день)

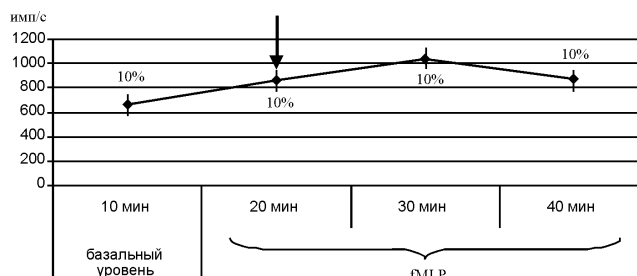


Рис. 2. Динамика изменения базального уровня образования O_2^- в пробах цельной крови пациентов с полипозным риносинуситом и их ответ на fMLP — формил пептид (1 мкМ, стрелкой показана добавка fMLP). После 5 сеансов NO-терапии (1 сеанс в день)

дит увеличение как базального уровня образования радикалов кислорода, так и усиление функционального ответа на стандартный стимулятор (fMLP). В результате проведения операции и дополнительного курса NO-терапии отмечается увеличение суммарной продукции O_2^- . Можно предположить, что это благоприятно воздействует на ведущий фактор патогенности, в качестве которого выступает бактериальная обсемененность слизистой оболочки носа и ОНП.

Как показывают исследования активности фагоцитов крови пациентов ПР через 6 мес, наблюдается сохранение высокой активности клеток системы врожденного иммунитета, что находило свое отражение как в исходном уровне активности фагоцитов крови, так и в ответах на fMLP. В мазке со слизистой оболочки носа встречались: Strep. гр D — 50%, enterococcus faecium — 10%, S.aureus — 12,5%, CNS — 12,5%, Neisseria spp. — 12,5%, E.coli — 12,5%, Candida spp. — 10%. Таким образом, показатели микробной обсемененности указывали на наличие дисбиоза слизистой оболочки носа. На 5-е сут. после хирургического вмешательства и проведения сеансов NO-терапии St. aureus в посевах из полости носа не выявлялся, но отмечалось увеличение обсемененности слизистой полости носа условно-патогенными микроорганизмами, в

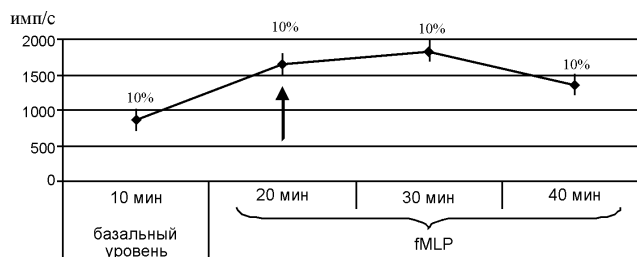


Рис. 4. Динамика изменения базального уровня образования O_2^- в пробах цельной крови пациентов с полипозным риносинуситом и их ответ на fMLP — формил пептид (1 мкМ, стрелкой показана добавка fMLP). Через 6 мес. после лечения

том числе коагулазонегативными стафилококками (CNS) на 12%. Таким образом, после операции, которая не влияет на обсемененность и последующей NO-терапией на фоне антибиотикотерапии позволяет у больных ПР снизить обсемененность микроорганизмами слизистой оболочки носа патогенными и условно-патогенными микроорганизмами.

В заключение следует отметить, что пациенты с ПР характеризуются исходно сниженной активностью фагоцитов крови, которые слабо отвечали на стандартный стимулятор. NO-терапия усиливает функциональную активность клеток врожденного иммунитета. В связи с этим можно сделать предположение, что антибактериальная терапия в совокупности с NO-терапией снижает значение ведущего фактора патогенности — обсемененности бактериями.

Список литературы

1. *Арефьева Н.А., Медведев Ю.А.* Иммунологические аспекты оториноларингологии // *Новости оториноларингологии и логопатологии.* — 1997. — №4. — С. 3—10.
2. *Бондарева Г.П., Терехова А.О.* Роль инфекции в формировании полипозного риносинусита у больных бронхиальной астмой // *Вестник оториноларингологии.* — 2010. — №3. — С. 9—11.
3. *Лопатин А.С.* Медикаментозное и хирургическое лечение полипозного риносинусита. Лечение синусита, ассоциированного с бронхиальной астмой // *Рос. Ринология.* — 1999. — №1. — С. 65—67.
4. *Миракян Р.Г.* Дифференциация полипозного риносинусита и их лечение // *Российская ринология.* — 2006. — №2. — С. 16—18.1.

5. *Bachert C., Gevaert P., Cauwenberge P.* Staphylococcus aureus superantigen and airway disease // *Curr. Allergy Asthma ReP.* — 2002. — №2. — P. 252—258.

6. *Deja M., Busch T., Bachmann S., Riskowski K., Campan V., Wiedmann B., Schwabe M., Hell B., Pfeilschifter J., Falke K.J., Lewandowski K.* Reduced nitric oxide in sinus epithelium of patients with radiologic maxillary sinusitis and sepsis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2003. — Vol. 1, №168(3). — P. 265—266.

7. *Fokkens W., Lund V., Mullol J.* et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. — 2007.

8. *Gevaert P.* Differentiation Between chronic sinusitis with and without nasal polyps based on cytokine profiles // *Российская ринология.* — 2006. — №2. — С. 32.

9. *Lindberg S., Cervin A., Runer T.* Low levels of nasal nitric oxide (NO) correlate to impaired mucociliary function in the upper airways // *Acta Otolaryngol.* — 1997. — Vol. 117, №5. — P. 728—734.

10. *Pasto M., Serrano E., Urocoste E.* et al. Nasal polyp-derived superoxide anion: dose-dependent inhibition by nitric oxide and pathophysiological implications // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. 163, №1. — P. 145—151.

11. *Richelman H.* Bacterial infection: does it play a role in eosinophilic inflammation and nasal polyposis? // *Российская ринология.* — 2006. — №2. — С. 34.

12. *Tavaf-Motamen H., Miner T.J., Starnes B.W.* et al. Nitric oxide mediates acute injury by modulation of inflammation // *J. Surg Res.* — 1998. — Vol. 78, №2. — P. 137—142.

13. *Xie Q.W., Kashiwarbara Y., Nathan C.* Role of transcription factor NFkB in induction of nitric oxide synthase // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269. — P. 4705—4708.

14. *Zhou B., Li H., Han D., Liu Z.* Role of ICAM-1 in eosinophilia and prognosis of nasal polyps // *Acta otolaryngol.* — 2005. — Vol. 125. — P. 745—752.

Получена 24.10.12

Сведения об авторах:

Асташкин Евгений Иванович, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. экстремальных состояний им. Чечулина НИО кардиологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

Егорова Нина Дмитриевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. экстремальных состояний им. Чечулина НИО кардиологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

Орехова Наталия Стефановна, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. лаб. экстремальных состояний им. Чечулина НИО кардиологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

Новикова А.Н., канд. биол. наук, лаборант-исследователь, лаб. экстремальных состояний им. Чечулина НИО кардиологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

Наседкин Алексей Николаевич, канд. мед. наук, проф. каф. оториноларингологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

Грачев Сергей Витальевич, д-р мед. наук, акад. РАМН, проф., директор НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ