

М. М. Островський, О. І. Варунків
ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ У ХВОРИХ НЕГОСПІТАЛЬНОЮ ПНЕВМОНІЄЮ НА ТЛІ ІШЕМІЧНОЇ ХВОРОБИ СЕРЦЯ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ВЕРИФІКАЦІЇ CHLAMYDOPHILA PNEUMONIA

Івано-Франківський національний медичний університет

Вступ

Одними з найбільш поширених захворювань людства залишаються хвороби органів дихання, котрі займають чільні місця за кількістю днів непрацездатності, інвалідизації населення та смертності, що завдає значних економічних затрат на державному рівні [3]. Питома вага їх серед усіх уперше виявлених захворювань складає 26,1% [2, 10]. Згідно даних резолюції IV з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України (20–22 жовтня 2008 р., м. Київ) негативною також є й динаміка за 2006–2007 роки: захворюваність на хвороби органів дихання зросла на 5,74 %, і перше місце в її структурі посіла пневмонія, захворюваність котрої зросла на 7,04 %, а смертність – на 20,51 %.

За сучасними уявленнями, пневмонія — гостре інфекційне захворювання, захворюваність яким коливається у широкому діапазоні від 1–11,6 випадків на тисячу серед осіб молодого та середнього віку, та до 25–44 випадків на тисячу осіб старших вікових груп [3, 4, 9]. У США щорічно діагностується 3–4 млн. хворих на негоспітальну пневмонію, із котрих більше ніж 900 тисяч лікуються у лікарнях, причому в 60 тисяч стаціонарних хворих дана патологія є безпосередньою причиною смерті [4, 9]. У країнах Євросоюзу кількість хворих на негоспітальну пневмонію протягом року перевищує 4,2 млн. осіб [8].

Клінічний перебіг негоспітальної пневмонії за останні роки помітно змінився, і в першу чергу це пов'язано зі збільшенням кількості верифікації атипичної мікрофлори, насамперед вірусної та хламідійної інфекції як можливого етіологічного чинника патології. Вважається, що від 5% до 15% негоспітальних пневмоній викликаються *Chlamydomphila pneumoniae*, а в період епідемії цей показник може становити 25%. [5, 11], летальність при яких становить 9,8% [6].

Досягнення науково-аналітичного та діагностичного прогресу помітно розширили уявлення про роль хламідій у патології людини. Хламідіоз — типовий приклад так званих „повільних бактеріальних інфекцій”, головні відмінні якості яких були сформульовані I.Blaser і J.Parsonnet у 1994 році.

Водночас, у сучасній медичній літературі є дані, що свідчать про роль *Chlamydomphila pneumoniae* в атерогенезі. Клінічні прояви атеросклерозу досить різноманітні. Вони можуть бути представлені ішемічною хворобою серця (ІХС), ураженням церебральних судин, судин нирок та кінцівок. В усьому світі ІХС є найпоширенішим захворюванням. В Україні приблизно 6–8 млн. пацієнтів з ІХС. За статистикою, причиною 62,5 із 100 смертей є серцево-судинні події, а за останні 10 років смертність від ІХС збільшилася на 9,3%, захворюваність і розповсюдженість відповідно у 2,2 і 1,6 разів [1].

У зв'язку з цим зрозумілою є цікавість до проблеми дестабілізації перебігу ішемічної хвороби серця при негоспітальній пневмонії в осіб, інфікованих *Chlamydomphila pneumoniae*, та ранньої випереджувальної діагностики процесів пускової активації несприятливих патофізіологічних зсувів, а значить й вираженості явищ як загальної гіпоксії організму хворого в цілому, так і локальної гіпоксії міокарду.

Цікавою, на нашу думку, в діагностичному аспекті є сполука оксиду азоту (NO), адже, як відомо, вона є медіатором запалення, бере активну участь в антимікробній діяльності, інгібує адгезію тромбоцитів і лейкоцитів, запобігає агрегації тромбоцитів і зменшує ріст гладких м'язів судин, що безперечно вплине на перебіг ІХС при розвитку негоспітальної пневмонії в умовах хламідійної присутності.

Оксид азоту викликає загибель багатьох типів патогенних мікроорганізмів, в тому числі й *Chlamydomphila pneumoniae* [20]. Для реалізації цієї програми використовуються два механізми: 1) апоптотична загибель клітин-носіїв, котра знищує сприятливе середовище для розмноження мікроорганізмів та дисемінації інфекційного процесу, 2) виділення токсичних для патогена субстанцій [7]. В основі антимікробної дії лежить здатність реактивних проміжних продуктів оксиду азоту викликати нітрозилування та дезамінування білків, окислювальне пошкодження і порушення системи репарації ДНК [15]. Цитотоксична дія NO підсилюється завдяки його здатності вступати в реакцію з супероксидним радикалом, у результаті чого утворюється пероксинітрит (ONOO–), який володіє набагато більшою реакційною здатністю, ніж NO або супероксидний радикал окремо, і синтезується згідно формули [13]: $H_2O_2 + NO = ONOO- + H$. За фізіологічних умов ONOO– утворюється в мінімальних кількостях. При низьких концентраціях ONOO– здатний викликати дилатацію судин, знижувати агрегацію тромбоцитів, експресію адгезивних молекул, він володіє також цитопротекторним властивостями і фактично є донором NO.

Підвищення рівня NO і вільних радикалів, що виникає при запальних захворюваннях, зокрема негоспітальній пневмонії, чи внаслідок хламідійної інфекції, створює умови для синтезу ONOO– і веде до значного збільшення його локальної концентрації в судинній стінці [14]. При високих концентраціях ONOO– дуже токсичний, індукуює апоптоз [18], блокує синтез простагліцину і підсилює синтез тромбоксану, викликає фрагментацію білків за рахунок нітрації амінокислот і ліпопротеїнів і цим самим ініціює автоімунні реакції до гаптенів [17], індукуює окислення ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), тобто призводить до утворення найважливішого чинника, що пошкоджує систему NOS–3 [14, 17].

Саме тому на нашу думку глибокого вивчення потребує метаболізм оксиду азоту при прогресуванні ішемічної хвороби серця в умовах виникнення і розвитку негоспітальної пневмонії на тлі хламідійної інфекції, адже збільшення концентрації оксиду азоту прямопропорційне утворенню пероксинітриту.

Метою даного дослідження є оцінка стану продуктів метаболізму оксиду азоту периферійної крові та бронхоальвеолярної рідини у хворих НП на тлі ІХС при детекції *Chlamydomphila pneumoniae*.

Матеріал та методи

Обстежено 102 пацієнти з НП віком від 50-ти до 65 років. Верифікацію діагнозу та його формулювання проводили згідно матеріалів наказу МОЗ України №128 від 19.03.2007р.— "Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Пульмо-

нологія" [3]. При обстеженні пацієнтів було виявлено, що 58 із них мали супутню патологію у вигляді ІХС (згідно з рекомендаціями VI Національного конгресу кардіологів України, 2000 р.), причому в 18-ти з них було верифіковано *Chlamydomphila pneumoniae*. Детекція *Chlamydomphila pneumoniae* проводилася методом виявлення в сироватці крові антихламідійних антитіл класу G за допомогою імуноферментного аналізу апаратом "StatFax 303 Plus" (SeroCP IgG, Savyon, Ізраїль). При позитивному результаті (титр 1:64) розпочинався наступний етап діагностики — визначення в сироватці крові IgA-антитіл до *Chlamydomphila pneumoniae* (обладнання та реагенти фірми SeroCP IgA, Savyon, Ізраїль) та полімеразної ланцюгової реакції з використанням обладнання та реагентів фірми "БіоКом" (РФ). Контрольну групу порівняння склали 17 практично здорових осіб (ПЗО) без наявних ознак захворювань респіраторного тракту та іншої патології внутрішніх органів.

Про вміст NO в плазмі крові судили за концентрацією його кінцевого стабільного метаболіту — нітриту (NO_2) і вмісту суми кінцевих метаболітів NO (нітрати + нітрит). Метод визначення вмісту NO_2 в плазмі венозної крові оснований на фотокалориметричному визначенні оптичної щільності забарвленого комплексу NO_2 з реактивом Грісса. Кров брали з ліктьової вени з використанням гепарину в якості антикоагулянта. Кров центрифугували при 2000 g протягом 5 хв. і заморожували сироватку при температурі -30°C до дослідження. Після відтавання зразка сироватку депротейнізували додаванням 0,5 моль/л розчину натрію гідроксиду (NaOH) і 100 г/л розчину сульфату цинку (ZnSO_4). Вміст пробірки перемішували і центрифугували протягом 15 хв. при 3000 g. Оскільки реакція діазотування з реактивом Грісса є специфічною тільки для NO_2 , то визначення нітратів необхідно проводити після їх попереднього відновлення. Відновлення нітратів до нітриту проводили за допомогою реакторів Nitralyzer™ (World Precision Instruments, Inc. США) в присутності 0,5M NH_4OH , pH 9,0 в якості буфера (відношення об'єму плазми до об'єму буфера 9:1). Надосадочну рідину змішували з рівним об'ємом реактиву Грісса (10 г/л сульфатніламід, 1 г/л нафтілендіаміну, 25 г/л фосфорної кислоти) та інкубували протягом 10 хв. при кімнатній температурі. Абсорбцію розчину вимірювали при довжині хвилі 546 нм на спектрофотометрі. Як стандарт використовували нітрит натрію, кількісний вміст нітриту в крові визначали за калібрувальною кривою (5–50 мкм NaNO_2).

Вміст NO в бронхоальвеолярній рідині (БАР) також визначали за концентрацією суми кінцевих метаболітів NO (нітрати + нітрит). Концентрації NO_2 та NO_3 була визначена в супернатанті БАР модифікованим методом реакції Грісса. Після розморожування зразка БАР були інкубовані протягом 3 години при температурі 20°C з додаванням реактивів: глюкозо-6-фосфат (500 ммоль/л), глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа (160 одиниць/л), відновлений нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (1 ммоль/л) і нітрат редуктази (20 одиниць/л), в фосфатному буфері (80 ммоль/л, pH 7.5). Рідину змішували з стандартним реактивом Грісса. Після подальшої інкубації при температурі 20°C протягом 10 хв., суміш вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 546 нм. Відновлення NO_3 до NO_2 як і в сироватці крові проводили з використанням редуктази нітратів за допомогою реактивів Nitralyzer™.

Результати та їх обговорення

Проведене дослідження показало, що у хворих на негоспітальну пневмонію вміст продуктів метаболізму оксиду азоту ($\text{NO}_3 + \text{NO}_2$) в периферійній крові незначно вище (6,83±0,29) ($p < 0,05$) у порівнянні з групою ПЗО (5,19±0,14) ($p < 0,01$) (табл.). Значно підвищилися показники

$\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ у хворих з негоспітальною пневмонією на тлі ІХС (12,74±1,09) ($p < 0,05$), проте найбільш виражене зростання даного показника було зафіксовано при детекції *Chlamydomphila pneumoniae* (21,38±1,86) ($p < 0,01$).

В БАР також збереглась динаміка наростання показників $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ у відповідних групах пацієнтів. Вміст продуктів метаболізму оксиду азоту був найбільшим при негоспітальній пневмонії на тлі дестабілізації перебігу ІХС в пацієнтів, інфікованих *Chlamydomphila pneumoniae* і склав (27,89±1,98) ($p < 0,01$) ммоль/мл, при показниках в контрольній групі (5,87±0,23) ($p < 0,05$) ммоль/мл; у хворих на негоспітальну пневмонію на ІХС він становив (11,95±1,18) ($p < 0,05$) ммоль/мл, а при негоспітальній пневмонії без супутньої патології — (7,98±0,78) ($p < 0,05$). Отримані результати можуть бути обумовлені зниженням рівня активного NO, що обумовлює вплив окислених ЛПНЩ, які вважаються одним з найважливіших чинників ризику атеросклерозу.

Поряд із значним зниженням утворення релаксуючих факторів окислених ЛПНЩ стимулюють синтез вазоконстрикторів — ендотеліну-1 та простагландину I_2 , які не тільки викликають стійкий судинний спазм, але й можливо є індукторами апоптозу ендотеліоцитів [22].

Основним чинником, що пошкоджує систему синтезу NO при запальних захворюваннях, зокрема й негоспітальній пневмонії, є окисданти стрес. Джерелами вільних радикалів при запаленні слугують лейкоцити, що містять, НАД(Ф) Н-оксидазу, здатну синтезувати цитотоксичні рівні вільних радикалів. Крім лейкоцитів, високі рівні радикалів може синтезувати циклооксигеназа ендотеліоцитів.

При високих концентраціях ONOO– індукує апоптоз [18], блокує синтез простагландину, підсилюючи при цьому продукцію тромбоксану та лейкотрієнів. ONOO– здатний активувати окислення ЛПНЩ і тим самим запускати інший механізм пошкодження системи синтезу NO [14, 17].

Зниження кількості NO, що діє, викликає зменшення контролю за силою зростання гладком'язових клітин і як наслідок проліферацію міоцитів, розростання інтим і формування бляшки [19].

Під впливом високих рівнів інтерлейкіну-1 та TNF- α , що значно зростають при негоспітальній пневмонії загалом та хламідійній інфекції зокрема [16], відсутність інгібуючої дії NO на ендотеліоцити призводить до значного збільшення експресії адгезивних молекул, це приводить до так званого "хомінгу" (скупчення) запальних клітин в ендотелії та субендотеліальному просторі. Надалі відбуваються захоплення макрофагами холестерину, різних ліпопротеїнів і формування "ядра" бляшки [19].

Таблиця

Сума кінцевих метаболітів оксиду азоту (нітратів (NO_3)/нітритів (NO_2)) у периферійній крові (ммоль/л) хворих та бронхоальвеолярній рідині (ммоль/мл) ($M \pm m$)

Показник	ПЗО, n=17	Хворі з негоспітальною пневмонією, n=44	Хворі з негоспітальною пневмонією на тлі ІХС, n=40	Хворі з негоспітальною пневмонією на тлі ІХС інфіковані <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , n=18
$\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ в крові (ммоль/л)	5,19±0,14	6,83±0,29	12,74±1,09	21,38±1,86
$\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ в БАР (ммоль/мл)	5,87±0,23	7,98±0,78	11,95±1,18	27,89±1,98

Можливим механізмом порушення синтезу NO та розвитку в судині проатерогенних змін є ушкоджувальна дія різних цитокінів (Інтерлейкіни-1, -6, TNF- α , IFN- γ), що набувають критично-високих рівнів як при запаленні, так і при інфікуванні *Chlamydomphila pneumoniae* [22]. Вони активують другу систему синтезу NO (NOS-2), здатну синтезувати токсичні кількості NO а отже й ONOO [23].

Рівень продукції цитокінів ендотелієм судин легень впливає на перебіг негоспітальної пневмонії. Активовані цитокінами і бактерійними ендотоксинами альвеолярні макрофаги підсилюють синтез NO [21], також збільшується рівень продукції NO й епітеліоцитами бронхів та альвеол, нейтрофілами, опасистими клітинами, ендотеліоцитами і гладком'язовими клітинами легеневи судин. Накопичуючись в клітинах в неадекватно великих кількостях, NO надає і пошкоджувальний ефект через синтез ONOO [12].

Таким чином, у пацієнтів, що мають ішемічну хворобу серця при розвитку негоспітальної пневмонії на тлі хламідійного інфікування продемонстрована можливість пошкодження системи синтезу NO внаслідок запального процесу в легенях, активної імунної відповіді на присутність інфекційного чинника, підвищення рівня окислених ЛПНЩ, проте питання про роль цих порушень в патогенезі прогресування ІХС залишається відкритим.

Висновки

Збільшення вмісту продуктів метаболізму оксиду азоту (нітратів (NO₃)/нітритів (NO₂)) в 4,1 рази в крові та в 4,8 рази в БАП є чіткою ознакою дестабілізації перебігу ішемічної хвороби серця в пацієнтів, інфікованих *Chlamydomphila pneumoniae* при негоспітальній пневмонії.

ЛИТЕРАТУРА

- Гуревич, М. А. Значение системы Na-уретических пептидов при сердечной недостаточности и артериальной гипертензии [Текст] / М. А. Гуревич, С. Р. Маравян // Кардиология. — 2003. — №9. — С.81–86.
- Мельник, В. П. Особливості клінічного перебігу негоспітальної пневмонії при супутньому інфікуванні *Chlamydomphila pneumoniae* [Текст] / В. П. Мельник, Д. С. Разборов, О. А. Сірош // Укр. пульмон. журн. — 2003. — № 1. — С. 47–49.
- Наказ МОЗ України №128 від 19.03.2007 "Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Пульмонологія".
- Негоспітальна пневмонія у дорослих: етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, антибактеріальна терапія [Текст] / Ю. І. Феценко [та ін.] // Укр. хіміотерапев. журн. — 001. — №3 — С. 58–64.
- Новиков, Ю. К. Атипичные пневмонии [Текст] / Ю. К. Новиков // Русский медицинский журнал. — 2002. — Т.10, №20. — С. 915–918.
- Ноников, В.Е. Диагностика и лечение атипичных пневмоний [Текст] / В. Е. Ноников // CONSILIUM medicum. — 2001. — Т.3, №12. — С. 569–574.
- Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций [Текст] / С. Я. Проскуряков [и др.] // Иммунология. — 2000. — № 4. — С. 9 — 20.
- Палеев, Н. Р. Болезни органов дыхания: Руководство для врачей [Текст] / Н. Р. Палеев. — М.: Медицина, 2000. — 726с.
- Феценко, Ю. І. Негоспітальна пневмонія у дорослих (етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, антибактеріальна терапія) [Матеріали III з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України] [Текст] / Ю. І. Феценко, О. Я. Дзюблик, О. О. Мухін // Укр. пульмон. журн. — 2003. — №2. — С. 18–31.
- Феценко, Ю. І. Основні тенденції епідеміологічної ситуації з туберкульозу та неспецифічних хвороб органів дихання в Україні [Текст] / Ю. І. Феценко, В. М. Мельник // Укр. пульмон. журн. — 1996. — № 4. — С. 5–9.
- Хамитов, Р. Ф. Mycoplasma pneumoniae и Chlamydomphila pneumoniae инфекции в пульмонологии: актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения [Текст] / Р. Ф. Хамитов, Л. Ю. Пальмова. — Казань : Казань, 2001. — 64 с.
- Alexander, R. W. Nitric oxide and peroxynitrite [Text] / R. W. Alexander // Hypertension. — 1995. — Vol.25. — P. 155–61.
- Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide [Text] / J. S. Beckman [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1990. — № 87. — P. 1620–1624.
- Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries: increased decomposition by superoxide in hypertension [Text] / M. R. Tschude [et al.] // Hypertension. — 1996. — № 27. — P. 32–35.
- Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry [Text] / J. S. Beckmann [et al.] // Biol. Chem. Hoppe Seyler. — 1994. — 1998. № 24. — P. 81–88.
- Kalayoglu, M. V. Induction of macrophage foam cell formation by Chlamydia pneumoniae [Text] / M. V. Kalayoglu, G. I. Byrne // J. Infect. Dis. — 1998. — Vol. 177. — P. 725–729.
- Liauder, L. Biology of nitric oxide signaling [Text] / L. Liauder, F. G. Soriano, C. Szabo // Crit. Care Med. — 2000. — № 28. — P 37–52.
- Maulik, N. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis [Text] / N. Maulik, T. Yoshida, D. K. Das // Free Radic. Biol. Med. — 1998. № 24. — P. 869–875.
- Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene [Text] / N. A. Chartrain [et al.] // J. Biol. Chem. — 1994. — № 269. — P. 6765–6772.
- Nathan, C. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens [Text] / C. Nathan, M. Shiloh // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, N 16. — P. 8841–8848.
- Nathan, C. T. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity [Text] / C. T. Nathan, J. B. Hibbs // Curr. Opin. Immunol. — 1991. — Vol.3. — P. 65–70.
- Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium [Text] / C. M. Boulanger [et al.] // Circulat. Res. — 1992. — № 70. — P. 1191–1197.
- Zhang, H. Nitric oxide differentially regulates induction of type II nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells versus macrophages [Text] / H. Zhang, C. Snead, D. John. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2001. — № 21. — P. 529–535.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ОКСИДА АЗОТА У БОЛЬНЫХ НЕГОСПИТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ НА ФОНЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЕРИФИКАЦИИ CHLAMYDOMPHILA PNEUMONIA

Н. Н. Островский, О. И. Варункис

Резюме

Целью данного исследования была оценка состояния продуктов метаболизма оксида азота (нитраты+нитриты) периферической крови и бронхоальвеолярной жидкости CHLAMYDOMPHILA PNEUMONIA у больных негоспитальной пневмонией на фоне ишемической болезни сердца при детекции Chlamydomphila pneumoniae. Состояние метаболизма оксида азота изучали у 102 пациентов с негоспитальной пневмонией в возрасте от 50 до 65 лет. Контрольную группу составили 17 практически здоровых лиц. Установлено, что у больных пневмонией возрастают показатели метаболизма оксида азота как в крови, так и в бронхоальвеолярной жидкости, при этом негативная динамика нарастает при сопутствующей ишемической болезни сердца и детекции хламидийной инфекции. Таким образом, увеличение содержания продуктов метаболизма оксида азота является четким признаком дестабилизации течения ишемической болезни сердца у пациентов, инфицированных Chlamydomphila pneumoniae при негоспитальной пневмонии.

NITRIC OXIDE METABOLISM IN PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA WITH CONCOMITANT ISCHEMIC HEART DISEASE DEPENDING ON THE VERIFICATION STATUS OF CHLAMYDOMPHILA PNEUMONIA

М. М. Ostrovskyy, O. I. Varunkis

Summary

The aim of this study was to evaluate the levels of metabolic products of nitric oxide (nitrates + nitrites) in peripheral blood and bronchoalveolar fluid in patients with community-acquired pneumonia, caused by Chlamydomphila pneumoniae with concomitant ischemic heart disease. The metabolism of nitric oxide was studied in 102 patients with community-acquired pneumonia aged 50 to 65 years. Control group consisted of 17 healthy individuals. We determined increasing indices of nitric oxide metabolism in blood and in bronchoalveolar fluid of patients with community-acquired pneumonia, especially when it was associated with coronary heart disease and detection of chlamydia infection. Thus, an increase of the content of nitrogen oxide metabolism products was a clear sign of the coronary heart disease worsening in patients with community-acquired pneumonia, caused by Chlamydomphila pneumoniae.