

## Динамика концентрации нитрита/нитрата и метгемоглобина в крови больных после трансплантации легких на фоне применения ингаляционного оксида азота

М.Ш. Хубутия, Е.В. Клычникова, Е.В. Тазина, Е.А. Тарабрин,  
Э.И. Первакова, А.А. Романов, О.А. Курилова, М.А. Годков  
ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», Москва  
Контакты: Елена Валерьевна Клычникова, E-mail: ltazina@yandex.ru

Открытие роли оксида азота (NO) в патогенезе острых и хронических расстройств легочного кровообращения способствовало внедрению ингаляционного NO (iNO) в комплексную терапию больных после трансплантации легких (ТЛ). В организме iNO может образовывать метгемоглобин (MetHb) и нитрат.

Цель исследования: изучение взаимосвязи iNO, уровня нитритов/нитратов (NOx) и MetHb в сыворотке крови 7 больных после ТЛ.

Продолжительность iNO-терапии составила  $3 \pm 1$  сутки, данные проанализированы с 1-х по 10-е сутки после операции. У больных обнаружено статистически значимое повышение уровня NOx с 1-х по 5-е сутки после операции, концентрация MetHb при этом оставалась в пределах нормы. Выявлены статистически значимые положительные корреляции: между фактом применения iNO и концентрацией NOx, фактом применения iNO и концентрацией MetHb, концентрациями NOx и MetHb. Полученные данные свидетельствуют о том, что при использовании iNO у больных после ТЛ необходимо контролировать как концентрацию вводимого iNO и MetHb в крови, так и уровень NOx.

**Ключевые слова:** трансплантация легких, ингаляционный оксид азота, нитрит/нитрат, метгемоглобин.

## Dynamic changes in blood concentrations of nitrite/nitrate and methemoglobin in patients after lung transplantation during treatment with inhaled nitric oxide

M.Sh. Khubutiya, E.V. Klychnikova, E.V. Tazina, E.A. Tarabrin,  
E.I. Pervakova, A.A. Romanov, O.A. Kurilova, M.A. Godkov  
N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow

Understanding of the nitric oxide (NO) role in the pathogenesis of acute and chronic disorders of the pulmonary circulation contributed to the introduction of inhaled NO (iNO) in the complex therapy of patients after lung transplantation. Inhaled NO can form methemoglobin (MetHb) and nitrate. The aim of the study was to investigate the relationship between iNO and nitrite/nitrate (NOx) and MetHb levels in the blood serum of 7 patients after lung transplantation. Duration of iNO therapy was  $3 \pm 1$  days, the data were reviewed at 1 to 10 days after transplantation. Patients showed significant improvement of the NOx level from day 1 to 5 after surgery, meanwhile the MetHb concentration remained within the normal range. The significant positive correlations were found between iNO and NOx concentrations, between iNO and MetHb concentrations, and between NOx and MetHb concentrations. The obtained results suggest that when using iNO in patients in lung transplantation, the concentration of the administered iNO, as well as blood levels of MetHb and NOx must be closely monitored.

**Keywords:** lung transplantation, inhaled nitric oxide, nitrite/nitrate, methemoglobin.

### ВВЕДЕНИЕ

Эндогенный оксид азота (NO) – вазодилататор, синтезируемый NO-синтазой из L-аргинина и действующий на уровне эндотелиальной выстилки кровеносных сосудов. NO принимает участие

в регуляции системного и легочного сосудистого сопротивления. В физиологических условиях NO в основном продуцируется эндотелиальной NO-синтазой (eNOS) [1, 2]. Альтернативная изоформа NO-синтазы – индуцибельная NO-синтаза (iNOS) – стимулируется цитокинами, бактери-

альными эндотоксинами и может продуцировать избыточные количества NO при воспалении или стрессе [2, 3].

Открытие роли дисфункции эндотелия легочных сосудов и нарушений синтеза NO в патогенезе острых и хронических расстройств легочного кровообращения способствовало внедрению ингаляционного NO (иNO) в комплексную терапию больных после трансплантации легких (ТЛ) как экзогенного аналога естественного регулятора сосудистого тонуса [4].

Во время ТЛ главная роль иNO, как полагают, заключается в его влиянии на легочное сосудистое сопротивление. При этом иNO может уменьшать легочное сосудистое сопротивление при легочной гипертензии без изменения системного сосудистого сопротивления, а также улучшать оксигенацию за счет расширения сосудов в вентилируемых зонах легких, снижая фракционный шунт [5–7]. Более того, иNO вероятно оказывает благоприятное воздействие после ТЛ благодаря уменьшению реперфузионного повреждения эндотелия и первичной недостаточности трансплантата.

Введение низких концентраций иNO представляется безопасным. Однако при высоких концентрациях его токсичность связана в основном с образованием NO<sub>2</sub> и метгемоглобинемией. Взаимодействие иNO с оксигемоглобином приводит к образованию метгемоглобина (MetHb) и нитрита/нитрата (NOx) [8]. Почти 70% иNO выделяются в течение 48 часов в виде нитратов с мочой [9]. Чрезмерные концентрации циркулирующего MetHb могут приводить к тканевой гипоксии [10]. MetHb не способен связывать кислород, поэтому при его образовании возникает гемическая гипоксия. Кроме того, в присутствии MetHb кривая диссоциации оксигемоглобина сдвигается влево, в результате чего снижается отдача кислорода тканям. Поэтому при ингаляционном введении NO следует контролировать концентрацию MetHb в крови. Однако практически отсутствуют исследования, посвященные изучению концентрации NOx в крови больных после ТЛ на фоне ингаляционного введения NO. В связи с этим целью данной работы являлось изучение взаимосвязи факта применения иNO с уровнями NOx и MetHb в крови пациентов после ТЛ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовали 7 больных (6 женщин и 1 мужчина) в возрасте от 24 до 55 (36,3 ± 4,0) лет после ТЛ.

Операции выполняли по поводу первичной легочной гипертензии, муковисцидоза (по 2 наблюдения), лимфангиолейомиоматоза, саркоидоза, а также идиопатического легочного фиброза (по 1 наблюдению).

Искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) проводили аппаратами Primus (в операционной) и EvitaXL (в отделении реанимации) в режиме, предусматривающем индивидуальный подбор параметров. Параметры ИВЛ и биомеханики легких регистрировали в режиме реального времени с помощью мониторинговой системы.

Для иNO-терапии использовали сертифицированную газовую смесь NO–NO<sub>2</sub> с концентрацией NO 1000 ppm (parts per million). Подачу иNO (5–20 ppm) осуществляли в инспираторную часть дыхательного контура аппарата ИВЛ на расстоянии 60–80 см от Y-образного коннектора. Для обеспечения малого потока газа использовали систему Bedfont Nitric Oxide Inhaled Therapy Flow. Объемную скорость потока иNO (мл/мин) устанавливали в соответствии с требуемой концентрацией и показаниями электрохимического NO–NO<sub>2</sub>-анализатора. Продолжительность иNO-терапии составила от 2 до 4 суток, средняя концентрация иNO – 30 ± 1 ppm.

Определение NOx в сыворотке крови проводили по методу, согласно которому кадмий в присутствии цинка восстанавливает нитрат до нитрита [11]. Оценку кислотно-основного состояния и газов крови, определение MetHb в артериальной крови выполняли на анализаторе ABL 800 Flex (Radiometer, Дания). Данные проанализированы с 1-х по 10-е сутки после операции. В качестве контрольной группы обследовали 25 практически здоровых людей, средний возраст которых составил 32,7 ± 8,6 года; соотношение мужчины/женщины – 17/8.

Статистический анализ проводили при помощи программ Statistica 10.0 и MS Excel. Для сравнения обследуемой группы больных с контрольной использовали U-критерий Манна–Уитни. Для изучения взаимосвязи признаков применяли метод корреляционного анализа Спирмена. Данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й и 75-й перцентили).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании концентрации NOx и MetHb в крови больных после ТЛ в динамике было обнаружено статистически значимое повышение

Таблица 1. Динамика в крови концентраций NOx и MetHb в группе больных после трансплантации (данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха)

Показатель	Норма	Сутки						
		1-е	2-е	3-и	4-е	5-е	7-е	10-е
NOx, мкмоль/л	18,61 (17,70–23,62)	67,73* (50,48–87,30)	72,05* (71,02–103,63)	79,49* (63,87–112,80)	54,98* (52,78–91,09)	45,77* (23,49–91,75)	13,37 (11,69–110,29)	17,38 (15,11–44,94)
MetHb, %	1,3 (1,0–1,4)	1,5 (1,3–1,5)	1,5 (1,4–1,7)	1,0 (1,0–1,2)	1,1 (0,9–1,3)	1,0 (0,8–1,1)	0,7 (0,7–0,9)	0,8 (0,7–1,0)

\* P < 0,05 по отношению к норме.

уровня NOx – в 3,6, 3,9, 4,3, 3,0 и 2,5 раза соответственно на 1-е, 2-е, 3-и, 4-е и 5-е сутки после операции (табл. 1). Графически динамика уровня NOx после ТЛ отдельно у каждого пациента представлена на рисунке. Из рисунка видно, что на протяжении 5 суток после операции у всех больных уровень NOx в сыворотке крови был выше нормы, далее у 6 пациентов его уровень постепенно снижался и к 10-м суткам практически достигал нормальных значений. Концентрация MetHb оставалась в пределах нормы (табл. 1).

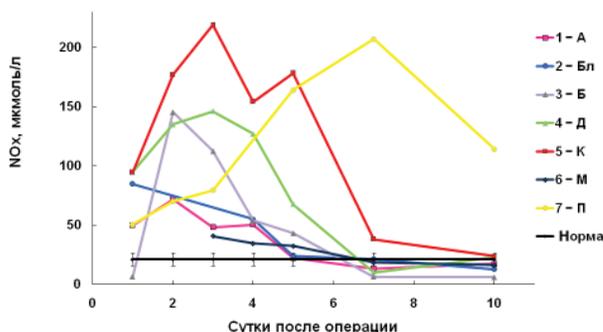


Рисунок. Динамика концентрации NOx у больных после трансплантации

Наши данные согласуются с данными W. Steudel et al, где показано, что значительная метгемоглобинемия или образование NO<sub>2</sub> редко встречается у пациентов, вдыхающих NO в дозах, меньших или равных 80 ppm [12]. Проходя через альвеолярно-капиллярную мембрану, иNO может взаимодействовать с кислородом, образуя NOx, или вступать в связь с оксигемоглобином, образуя не только NOx, но и MetHb. Учитывая метаболизм иNO в организме, мы изучали взаимосвязь факта применения иNO с концентрацией MetHb в цельной крови и с NOx в сыворотке крови у больных после ТЛ.

В нашем исследовании в общей группе пациентов после ТЛ наблюдались следующие статистически значимые положительные корреляции:

между фактом применения иNO и концентрацией NOx, фактом применения иNO и концентрацией MetHb, концентрацией NOx и MetHb (табл. 2). Эти данные указывают на происходящий метаболизм иNO в организме с образованием NOx и MetHb.

Таблица 2. Взаимосвязь факта применения иNO, уровня в крови NOx и MetHb в группе больных после трансплантации

Показатель	иNO	NOx	MetHb
NOx	R = 0,866, P = 0,012 (N = 7)	–	R = 0,870, P = 0,002 (N = 4)
MetHb	R = 0,840, P = 0,036 (N = 4)	R = 0,870, P = 0,002 (N = 4)	–

Более того, в наших исследованиях обнаружены статистически значимые положительные корреляции отдельно у каждого больного после ТЛ:

- между фактом применения иNO и концентрацией NOx у пациентов 2, 3, 4 (табл. 3);
- между фактом применения иNO и концентрацией MetHb у больной 4 (табл. 3);
- между концентрацией NOx и MetHb у пациентов 1 и 4 (табл. 3).

Полученные нами корреляции по конкретным больным также подтверждают тот факт, что иNO метаболизируется в организме с образованием главным образом NOx.

Учитывая увеличение количества ТЛ, ежегодно выполняемых во всем мире, необходимо проводить углубленные исследования метаболизма NO в сыворотке крови пациентов после успешных ТЛ и больных с острым или хроническим отторжением трансплантата. При этом изучению концентрации стабильных метаболитов NO у пациентов после ТЛ посвящено всего несколько работ. Так, De Andrade et al. [13] отмечали значительное увеличение концентрации общего NOx в бронхоальвеолярной жидкости, полученной при лаваже (БАЛ), и в сыворотке крови больных после ТЛ по сравнению с контролем. Эти же ученые пока-

Таблица 3. Взаимосвязь факта применения иNO, уровня NOx и MetHb у пациентов после трансплантации

Пациенты	Корреляции		
	иNO и NOx	иNO и MetHb	NOx и MetHb
1 – А	R = 0,545, P = 0,129	R = 0,521, p = 0,150	<b>R = 0,720, P = 0,029</b>
2 – Бл	<b>R = 0,828, P = 0,042</b>	R = 0,105, P = 0,843	R = 0,174, P = 0,742
3 – Б	<b>r = 0,779, p = 0,013</b>	–	–
4 – Д	<b>R = 0,853, P = 0,002</b>	<b>R = 0,880, P = 0,0008</b>	<b>R = 0,900, P = 0,0004</b>
5 – К	R = 0,293, P = 0,573	–	–
6 – М	R = 0,393, P = 0,441	–	–
7 – П	<b>R = -0,693, P = 0,039</b>	R = 0,044, P = 0,911	R = -0,328, P = 0,389

зали, что концентрация NOx в сыворотке крови пациентов коррелирует со степенью воспаления дыхательных путей и фиброза вследствие отторжения трансплантата [14]. Reid et al. [15] подтвердили данные об увеличении уровня нитритов у больных после ТЛ, однако при выделении

группы стабильных пациентов и больных с облитерирующим бронхолитом только у последних наблюдалось значительное увеличение уровня нитритов в БАЛ. Повышение уровня циркулирующих нитратов отмечено в экспериментальных исследованиях на животных с острым клеточным отторжением трансплантата [16, 17].

В наших исследованиях у больных с 1-х по 5-е сутки после ТЛ обнаружено статистически значимое повышение уровня NOx примерно в 3–4 раза и выявлена статистически значимая положительная корреляция между фактом применения иNO и концентрацией NOx. Заметное увеличение концентрации NOx в сыворотке крови больных на 1–5-е сутки после ТЛ, возможно, связано не только с метаболизмом иNO до NOx, а также с активацией iNOS, что требует дальнейшего изучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что при использовании иNO у больных после ТЛ необходимо контролировать как концентрацию вводимого иNO и MetHb в крови, так и уровень нитрита/нитрата.

Литература

1. McQuitty, C.K. Con: Inhaled nitric oxide should not be used routinely in patients undergoing lung transplantation / C.K. McQuitty // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* – 2001. – Vol. 15, N. 6. – P.790-792.
2. Marczin, N. The biology of exhaled nitric oxide (NO) in ischemia-reperfusion-induced lung injury: a tale of dynamics of NO production and consumption / N. Marczin // *Vascul. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 43, N. 6. – P. 415-424.
3. Inhaled nitric oxide attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of the rabbit lung / H. Yamashita, S. Akamine, Y. Sumida [et al.] // *Ann. Thorac. Surg.* – 2004. – Vol. 78, N. 1. – P. 292-297.
4. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome / R. Rossaint, K.J. Falke, F. Lopez [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 328, N.6. – P. 399-405.
5. Hemodynamics during inhaled nitric oxide in lung transplant candidates / G. Della Rocca, F. Pugliese, M. Antonini [et al.] // *Transplant Proc.* – 1997. – Vol. 29, N. 8. – P. 3367-3370.
6. Intraoperative inhaled nitric oxide during anesthesia for lung transplant / G.D. Rocca, C. Coccia, F. Pugliese [et al.] // *Transplant Proc.* 1997. – Vol. 29, N. 8. – P. 3362-3366.
7. Meyer, K.C. The therapeutic potential of nitric oxide in lung transplantation / K.C. Meyer, R.B. Love, J.J. Zimmerman // *Chest.* – 1998. – Vol. 113, N. 5. – P. 1360-1371.
8. Ichinose, F. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential / F. Ichinose, J.D. Roberts Jr., W.M. Zapol // *Circulation.* – 2004. – Vol. 109, N. 25. – P. 3106-3111.
9. Young, J.D. Kinetics of methaemoglobin and serum nitrogen oxide production during inhalation of nitric oxide in volunteers / J.D. Young, J.W. Sear, E.M. Valvini // *Br. J. Anaesth.* – 1996. – Vol.76, N. 5. – P. 652-656.
10. The toxicology of inhaled nitric oxide / B. Weinberger, D.L. Laskin, D.E. Heck, J.D. Laskin // *Toxicol. Sci.* – 2001. – Vol. 59, N. 1. – P. 5-16.
11. Голиков, П.П. Метод определения нитрита/нитрата (NOx) в сыворотке крови / П.П. Голиков, Н.Ю. Николаева // *Биомед. химия.* – 2004. – № 1. – С. 79-85.
12. Steudel, W. Inhaled nitric oxide: basic biology and clinical applications / W. Steudel, W.E. Hurford, W.M. Zapol // *Anesthesiology.* – 1999. – Vol. 91, N. 4. – P. 1090-1121.
13. Protein nitration, metabolites of reactive nitrogen species, and inflammation in lung allografts / J.A. De Andrade, J.P. Crow, L. Viera [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 161, N. 6. – P. 2035-2042.
14. Reactive nitrogen species, airway inflammation, and fibrosis in lung transplant / J.A. De Andrade, J. Crow, L. Viera [et al.] // *Chest.* – 2001. – Vol. 120, Suppl. 1. – S58-S59.
15. Iron overload and nitric oxide-derived oxidative stress following lung transplantation / D. Reid, G. Snell, C. Ward [et al.] // *J. Heart Lung Transplant.* – 2001. – Vol. 20, N. 8. – P. 840-849.
16. Increased levels of circulating nitrates and impaired endothelium-mediated vasodilation suggest multiple roles of nitric oxide during acute rejection of pulmonary allografts / L. Wiklund, D.H. Lewis, P.O. Sjöquist [et al.] // *J. Heart Lung Transplant.* – 1997. – Vol. 16, N.5. – P. 517-523.
17. Inducible nitric oxide synthase is expressed during experimental acute lung allograft rejection / N.K. Worrall, C.H. Boasquevisque, T.P. Misko [et al.] // *J. Heart Lung Transplant.* – 1997. – Vol. 16, N. 3. – P. 334-339.

References

1. McQuitty C.K. Con: Inhaled nitric oxide should not be used routinely in patients undergoing lung transplantation. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2001; 15, (6): 790–792.
2. Marczin N. The biology of exhaled nitric oxide (NO) in ischemia-reperfusion-induced lung injury: a tale of dynamism of NO production and consumption. *Vascul. Pharmacol.* 2005; 43 (6): 415–424.
3. Yamashita H., Akamine S., Sumida Y., [et al.]. Inhaled nitric oxide attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of the rabbit lung. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 78 (1): 292–297.
4. Rossaint R., Falke K.J., Lopez F., [et al.]. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328 (6): 399–405.
5. Della Rocca G., Pugliese F., Antonini M., [et al.]. Hemodynamics during inhaled nitric oxide in lung transplant candidates. *Transplant Proc.* 1997; 29 (8): 3367–3370.
6. Rocca G.D., Coccia C., Pugliese F., [et al.]. Intraoperative inhaled nitric oxide during anesthesia for lung transplant. *Transplant Proc.* 1997; 29 (8): 3362–3366.
7. Meyer K.C., Love R.B., Zimmerman J.J. The therapeutic potential of nitric oxide in lung transplantation. *Chest.* 1998; 113 (5): 1360–1371.
8. Ichinose F., Roberts Jr. J.D., Zapol W.M. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. *Circulation.* 2004; 109 (25): 3106–3111.
9. Young J.D., Sear J.W., Valvini E.M. Kinetics of methaemoglobin and serum nitrogen oxide production during inhalation of nitric oxide in volunteers. *Br. J. Anaesth.* 1996; 76 (5): 652–656.
10. Weinberger B., Laskin D.L., Heck D.E., Laskin J.D. The toxicology of inhaled nitric oxide. *Toxicol. Sci.* 2001; 59 (1): 5–16.
11. Golikov P.P., Nikolaeva N.Yu. Metod opredelenija nitrita/nitrata (NOx) v syvorotke krovi [Method for determination of nitrite/nitrate (NOx) in serum]. *Biomed. himiya.* 2004; 1: 79–85. (In Russian).
12. Steudel W., Hurford W.E., Zapol W.M. Inhaled nitric oxide: basic biology and clinical applications. *Anesthesiology.* 1999; 91 (4): 1090–1121.
13. De Andrade J.A., Crow J.P., Viera L., [et al.]. Protein nitration, metabolites of reactive nitrogen species, and inflammation in lung allografts. *Crit. Care Med.* 2000; 161 (6): 2035–2042.
14. De Andrade J.A., Crow J., Viera L., [et al.]. Reactive nitrogen species, airway inflammation, and fibrosis in lung transplant. *Chest.* 2001; 120 (1): S58–S59.
15. Reid D., Snell G., Ward C., [et al.]. Iron overload and nitric oxide-derived oxidative stress following lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* 2001; 20 (8): 840–849.
16. Wiklund L., Lewis D.H., Sjöquist P.O., [et al.]. Increased levels of circulating nitrates and impaired endothelium-mediated vasodilation suggest multiple roles of nitric oxide during acute rejection of pulmonary allografts. *J. Heart Lung Transplant.* 1997; 16 (5): 517–523.
17. Worrall N.K., Boasquevisque C.H., Misko T.P., [et al.]. Inducible nitric oxide synthase is expressed during experimental acute lung allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant.* 1997; 16 (3): 334–339.