

ПЕЧЕРКИНА ИРИНА НИКОЛАЕВНА

**ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ФОРМИРОВАНИЯ
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ
У КУРЯЩИХ**

14.00.43 – пульмонология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

профессор Черногорюк Г.Э.

ТОМСК-2009

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Черногорюк Георгий Эдинович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Кобякова Ольга Сергеевна

доктор медицинских наук, профессор

Гриднева Татьяна Дмитриевна

Ведущая организация: ГОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Росздрава

Защита состоится « » _____ 2009 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.02 при ГОУ ВПО Сибирский Государственный медицинский университет Росздрава

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

Автореферат разослан « » _____ 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Тюкалова Л.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) признана приоритетной сферой для менеджмента здравоохранения и развития новых терапевтических стратегий. Это связано с высокой заболеваемостью и смертностью, ассоциированными с этим состоянием. ХОБЛ стоит на четвертом месте по уровню заболеваемости и смертности, и предполагается, что выйдет на пятое место в 2020г. по ущербу, наносимому болезнями в глобальном масштабе (GOLD, 2001г., 2003г., 2006г., 2007г.). По официальным данным МЗ РФ в стране насчитывается 1 млн. больных ХОБЛ, в то время как согласно эпидемиологическим исследованиям их должно быть более 11 млн. (А.Г. Чучалин, 1997; З.Р. Айсанов, 2001). Хроническая обструктивная болезнь легких приводит к инвалидизации в среднем через 10 лет после установления диагноза и более чем в половине случаев это лица моложе 50 лет (З.Р. Айсанов, 2001).

Известно, что ведущим этиологическим фактором развития ХОБЛ является курение, и что заболевание развивается примерно у 15-20% курящих. У курильщиков сигарет наблюдается повышенная распространенность респираторных симптомов и расстройств легочной функции, повышенное годовое снижение ОФВ₁ и повышенная смертность от ХОБЛ по сравнению с некурящими. Для этой категории характерен дозозависимый риск развития ХОБЛ (А.М. Schols, 1993). К большому сожалению, больные ХОБЛ обращаются за медицинской помощью уже на поздних стадиях заболевания, когда возможности терапии крайне ограничены. Существует субклинический период заболевания, который может продолжаться от 3-4 до 10 лет. В этот период пациент обычно не обращается за медицинской помощью и, как следствие, не предпринимаются активные меры по устранению (минимизации) действия внешних факторов риска. Таким образом, факторы риска продолжают действовать на пациента на протяжении длительного времени, затрагивая не только респираторную систему (Е.И. Шмелев, 2007). В связи с этим, есть необходимость в достоверных и доступных тестах, позволяющих в донозологический период показать, что у конкретного курильщика с высокой степенью вероятности может развиваться ХОБЛ.

В документе «Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2007г.)» указано, что «... развитие ХОБЛ связано с патологическим воспалительным ответом легких на действие ингалируемых частиц или газов». Компоненты табачного дыма оказывают непосредственное повреждающее действие на бронхолегочную ткань, инициируют воспалительный процесс с активацией нейтрофилов и макрофагов, влияют на баланс протеолитических ферментов и антипротеаз, приводят к развитию оксидативного стресса. Развитие ХОБЛ является результатом взаимодействия генетических факторов и воздействия факторов окружающей среды. Поиск биомаркеров воспаления в субклинический период заболевания, ассоциированных с риском формирования ХОБЛ, может исходить из того, что

у части курящих, без основного клинического признака ХОБЛ – ограничения скорости воздушного потока в бронхах, характеристики воспаления в бронхиальном регионе, инициированные табачным дымом, могут быть идентичны таковым при клинически выраженной болезни.

Диагностика на этапе предболезни позволит выявлять среди курильщиков субъектов, которые эволюционируют к клинически выраженной стадии заболевания, проявляющейся ограничением скорости воздушного потока. Своевременная медицинская помощь этим лицам предотвратит формирование ХОБЛ или, по крайней мере, замедлит её прогрессирование.

Цель: установить биомаркеры воспаления и морфофункциональные характеристики нейтрофилов, ассоциированные с повышенным риском формирования хронической обструктивной болезни легких у курящих.

Задачи:

1. Сравнить количественные значения биомаркеров воспаления и морфофункциональные свойства нейтрофилов при стабильном течении ХОБЛ с количественными значениями этих показателей у здоровых курящих и некурящих.
2. Определить распространенность показателей биомаркеров воспаления у здоровых курящих и некурящих, соответствующие доминирующим количественным значениям при ХОБЛ.
3. Изучить соотношение исследуемых биомаркеров воспаления и морфофункциональных свойств нейтрофилов с параметрами внешнего дыхания у здоровых курящих и с клиническими проявлениями ХОБЛ.
4. Определить чувствительность, специфичность и прогностические значения биомаркеров воспаления, предлагаемых в качестве тестов для определения риска развития ХОБЛ.

Научная новизна

Впервые выявлены биомаркеры воспаления, ассоциированные с риском развития ХОБЛ у курящих и определены их количественные значения.

Факторами риска развития ХОБЛ у курящих являются: содержание катионных протеинов в нейтрофилах индуцированной мокроты в значении 100 оптических ед. плотности и выше; активность α_2 -макроглобулина в индуцированной мокроте в значении 19 ИЕ/мл и менее; количество макрофагов в индуцированной мокроте в значении 8% и менее; активность α_1 -протеиназного ингибитора в индуцированной мокроте в значении 100 ИЕ/мл и менее.

Впервые показано, что биомаркеры воспаления, идентифицированные с риском развития ХОБЛ у здоровых курящих: количество макрофагов и нейтрофилов в индуцированной мокроте, активность α_1 -протеиназного, α_2 -макроглобулина, трипсиноподобных протеиназ в индуцированной мокроте, количество апоптотически измененных нейтрофилов в «кожном окне», содержание катионных протеинов, активность миелопероксидазы в нейтрофилах крови и индуцированной мокроте у больных ХОБЛ коррелируют с клиническими характеристиками болезни.

Впервые у практически здоровых курящих установлена отрицательная корреляция скорости воздушного потока в бронхах с биомаркерами воспаления, ассоциированными с риском развития ХОБЛ: количеством нейтрофилов в индуцированной мокроте, количеством апоптозных нейтрофилов в «кожном окне», содержанием катионных протеинов, активностью миелопероксидазы в нейтрофилах крови и индуцированной мокроты.

Впервые у практически здоровых курящих выявлена прямая связь скорости воздушного потока в бронхах с количеством макрофагов, активностью α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина в индуцированной мокроте, что позволяет рассматривать эти биомаркеры воспаления в качестве вероятных факторов толерантности к развитию ХОБЛ.

Практическая значимость работы

Определение биомаркеров воспаления, ассоциированных с высоким риском заболевания ХОБЛ, позволит выявлять лиц склонных к развитию этого заболевания на этапе предболезни и предупредить эволюцию патологического процесса в клинически выраженную форму заболевания путем проведения комплекса лечебно-профилактических мероприятий. Эти мероприятия включают: прекращение воздействия внешних факторов риска (курения, в частности), проведение мероприятий по предупреждению и своевременному лечению острых респираторных заболеваний, осуществление контроля за функцией внешнего дыхания, лечение хронического необструктивного бронхита, инициированного курением табака и другими поллютантами.

Положения, выносимые на защиту

1. Биомаркеры воспаления: количество макрофагов и нейтрофилов в ИМ, активность α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина, трипсиноподобных протеиназ в ИМ, количество апоптозных нейтрофилов в «кожном окне», содержание катионных протеинов, миелопероксидазы в нейтрофилах крови и индуцированной мокроте, коррелируют с клиническими характеристиками у пациентов с ХОБЛ и скоростными показателями вентиляции легких у практически здоровых курящих.

Высокий риск формирования ХОБЛ у курящих ассоциируется: с содержанием катионных протеинов в нейтрофилах индуцированной мокроты в значении 100 оптических ед. плотности и выше; с активностью α_2 -макроглобулина в индуцированной мокроте в значении 19 ИЕ/мл и менее; с количеством макрофагов в индуцированной мокроте в значении 8% и менее; с активностью α_1 -протеиназного ингибитора в индуцированной мокроте в значении 100 ИЕ/мл и менее.

Апробация работы

Материалы исследования доложены и обсуждены на XII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», (Москва, 2005г), на 6-й Международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке (Москва, 2005г.), I съезде терапевтов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2005г.), 15 Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Москва, 2005г.), Европейском респираторном конгрессе (Мюнхен, 2006г.), 7-

ом конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2006г., 2007г., 2008г.), 7-й Международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке (Москва, 2006г.), на практической конференции для врачей ОГУЗ «Областная клиническая больница» (2006г.), Европейском респираторном конгрессе (Стокгольм, 2007г.), на проблемной комиссии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава по пульмонологии, на заседаниях кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины.

Внедрение результатов исследования

Результаты работы применяются в учебном процессе кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, в лечебном процессе пульмонологического отделения ОГУЗ «Томская областная клиническая больница».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 печатные работы, из них 2 статьи в журналах из «Перечня ...» ВАК РФ. Получены три патента на изобретения (№2298183, №2298184 от 27 апреля 2007г.; Бюллетень изобретений №12, 2007г.; №2359618 от 27 июня 2009г.; Бюллетень изобретений №18, 2009г.).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 183 страницах машинописного текста, содержит 55 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования (вторая глава), результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

Библиографический указатель содержит 400 источников литературы, из которых 76 отечественных и 324 зарубежных.

Группы наблюдения и методы исследования

Проведено обследование 103 пациентов с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких, находившихся на лечении в пульмонологическом отделении ОГУЗ «Томская областная клиническая больница», в клиниках ФГОУ ВПО «Томского военно-медицинского института» МО РФ с 2005 по 2008г., а также 143 практически здоровых добровольца. Вид исследования: проспективное когортное. Когорта формировалась во время исследования. Контингент здоровых, в зависимости от ирритативного фактора, представлен четырьмя группами обследуемых: здоровые, никогда некурящие мужчины (n=17, возраст 39 – 57 лет, средний возраст – $48,6 \pm 1,4$ лет), практически здоровые курящие с относительно коротким анамнезом курения $10,4 \pm 0,7$ пачка/лет (n=86, возраст 29 – 53 года, средний возраст – $33,4 \pm 1,1$ лет), практически здоровые курящие с длительным анамнезом курения – $35,1 \pm 2,1$ пачка/лет (n=40, возраст 40 – 56 лет, средний возраст $47,2 \pm 0,6$ лет). Длительное курение у части пациентов этой группы инициировало развитие необструктивного хронического бронхита, проявляющегося непостоянным утренним кашлем с выделением слизистой мокроты в небольшом количестве (30 пациентов). Для представителей групп курящих возможно, но необязательно, наличие кашлевого синдрома.

Условиями для включения в группу здоровых никогда некурящих были: отсутствие кашлевого анамнеза, бронхиальной астмы, бронхита, патологических изменений при обзорной рентгенографии легких, нормальные показатели функции внешнего дыхания по данным спирографии, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних трех месяцев. Условиями включения в группы здоровых курящих были: соответствующий анамнез курения, отсутствие бронхиальной астмы, бронхита, других атопических заболеваний, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних трех месяцев, нормальные показатели функции внешнего дыхания по данным спирографии. Интенсивность курения оценивалась анамнезом курящего человека (пачка/лет: число выкуриваемых сигарет в сутки \times стаж курения (годы)/ 20).

В группу больных были включены 103 человека с диагнозом ХОБЛ вне обострения в возрасте от 41 до 70 лет, средний возраст составил $57,1 \pm 1,7$ года. Из них со второй стадией ХОБЛ II стадия – 14 человек, III стадия – 41, IV-я стадия – 48. В зависимости от ирритативного фактора больные ХОБЛ распределились следующим образом. Курящие: II стадия – 12 пациентов (18,5%), III стадия – 22 (33,8%), IV стадия – 31 (47,7%). Бывшие курящие: II стадия – 2 (8,7%), III стадия – 11 (47,8%), IV стадия – 10 (43,5%). Никогда некурящие: III стадия – 8 (53,3%), IV стадия – 7 (46,7%). В исследование не включались пациенты с наличием атопических заболеваний, заболеваний воспалительного характера (пневмония и т.д.), с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и выраженной сердечной недостаточностью (III–IV ФК по NYHA), другими тяжелыми сопутствующими заболеваниями. Клиническое обследование пациентов проводилось в соответствии с регламентом GOLD 2007г. Весь контингент обследованных представлен мужчинами. На выполнение всех процедур было получено письменное согласие всех больных ХОБЛ и всех здоровых добровольцев. Дизайн работы одобрен этическим комитетом Сибирского Государственного Медицинского Университета.

Методы исследования

I. Клинико-анамнестические

1. Диагностика ХОБЛ, оценка степени тяжести заболевания осуществлялась согласно критериям, изложенным в GOLD 2007г.
2. Количественная оценка степени выраженности клинических симптомов (одышка, кашель, количество мокроты, частота ночного удушья, число свистящих хрипов) в баллах по шкале, предложенной Ю.Л. Кунициной и Е.И. Шмелевым (2003)

II. Функциональные

1. Оценка функции внешнего дыхания: анализ показателей спирометрии (спирограф «Spiro Pro»)
2. Тест с 6-мин. ходьбой проводился в соответствии со стандартным протоколом.

III. Цитологические

Цитологическое исследование индуцированной мокроты, отпечатка «кожного окна».

IV. Цитохимические методы

1. Цитохимический анализ нейтрофилов индуцированной мокроты, периферической крови, с определением содержания миелопероксидазы, катионного протеина, с применением компьютерной морфометрии для количественной оценки внутриклеточных включений. Получены патенты на изобретение №2298183, №2298184 от 27 апреля 2007г. (бюллетень изобретений №12, 2007г) «Способ определения активности миелопероксидазы в нейтрофилах и эозинофилах мокроты» и «Способ определения продуктов цитохимической реакции, протекающей в нейтрофилах и эозинофилах мокроты под воздействием миелопероксидазы», №2359618 от 27 июня 2009г. (бюллетень изобретений №18, 2009г) «Способ прогнозирования риска развития хронической обструктивной болезни легких у длительно курящих лиц».
2. Цитохимический анализ нейтрофилов «кожного окна» с определением содержания миелопероксидазы (J. W. Rebusk, 1955; Д. Н. Маянский, 1997).

V. Биохимические методы

Исследование эластазы, трипсиноподобных протеиназ, каллекреина, каллекреиногена, кислотостабильных ингибиторов, α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина, малонового диальдегида, каталазы, супероксиддисмутазы в индуцированной мокроте.

VI. Статистический анализ

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ STATISTICA 6,0 (StatSoft, USA). Для сравнения групп и исследования связей использовались непараметрические методы (критерий Манн-Уитни, корреляции Спирмена, хи-квадрат Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность). Пороговый уровень статистической значимости принимался при значении критерия $p < 0,05$.

Основные результаты исследования и обсуждение

С целью определения возможности использования биомаркеров воспаления в качестве прогностических тестов развития ХОБЛ у курящих исследовались три группы показателей: протеиназ-антипротеиназной, оксидант-антиоксидантной, калликреин-кининовой систем в бронхиальном регионе, цитологические показатели ИМ и цитохимические характеристики нейтрофилов бронхиального региона и крови, цитологические и цитохимические показатели в отпечатке КО. Материал по каждой группе биомаркеров проанализирован в следующей последовательности:

- сравнение средних величин значений исследуемых маркеров воспаления при ХОБЛ и у здоровых курящих с различным анамнезом курения, а также у здоровых никогда некурящих;
- выбор биомаркеров воспаления, которые могут быть исследованы в качестве тестов;
- определение направленности изменений этих показателей при ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими и некурящими (уменьшение или увеличение);

- определение доминирующих значений биомаркера при ХОБЛ, которое представляет среднюю величину показателя с поправкой на ошибку средней и указанием «и более», «и менее», в зависимости от направленности изменений значений показателя при ХОБЛ (в отличие от здоровых);
- определение частоты встречаемости у здоровых курящих значений показателей, доминирующих при ХОБЛ;
- сопоставление частоты встречаемости доминирующих при ХОБЛ значений показателя с частотой встречаемости этих значений у здоровых курящих и некурящих;
- оценка чувствительности, специфичности и прогностических значений изучаемого биомаркера воспаления в качестве теста, определяющего вероятность развития ХОБЛ у курящих (J.M. Bland;1994);
- анализ соотношений исследуемого маркера воспаления с клиническими и спирометрическими характеристиками при ХОБЛ и спирометрическими показателями у здоровых курящих.

Определение ассоциированности цитологических показателей ИМ, цитохимических и цитометрических характеристик нейтрофилов бронхиального региона и крови с риском развития ХОБЛ у курящих

Сравнение цитологических показателей ИМ у здоровых курящих с различной длительностью анамнеза курения, здоровых никогда некурящих и при ХОБЛ выявило ряд статистически значимых различий. Так как наиболее значимые из них относились к количеству нейтрофилов и макрофагов, эти показатели были определены для дальнейшего анализа в качестве показателей тестирующих прогноз развития ХОБЛ у курящих (табл. 1).

Таблица 1

Цитологические характеристики индуцированной мокроты у здоровых курящих, никогда некурящих и при ХОБЛ (M±m)

Показатель	Курящие, 35,1 ± 2,1 пачка/лет n=26	Курящие, 10,4 ± 0,7 пачка/лет n=45	Некурящие n=13	ХОБЛ II-IV стадии, n=80	P
	1	2	3	4	
Нейтрофилы (%)	58,58 ± 4,9	67,38±2,66	64,38±9,11	86,41±1,13	P _{1,2-4} <0,00001 P ₃₋₄ =0,017
Макрофаги (%)	35,96±4,46	28,87±2,5	34,0±4,92	6,61±0,81	P _{1,2-4} <0,00001 P ₃₋₄ =0,029

Поскольку среднее количество нейтрофилов было 86,4±1,1% и при ХОБЛ, по сравнению со здоровыми всех исследуемых категорий, увеличивалось, то доминирующее количество нейтрофилов ИМ определили как «85% и более». При этом, учитывали минимальное среднее значение количества нейтрофилов, вычитая из средней величины ошибку средней. В отношении макрофагов, используя аналогичные расчеты, доминирующий уровень был определен как 8%

и менее. Частота доминирующего количества нейтрофилов и макрофагов у курящих с различной длительностью курения и у никогда некурящих представлена в таблице 2.

В таблице 3 приведены показатели чувствительности, специфичности и прогностические значения обнаружения процентного количества нейтрофилов (85% и более) и макрофагов (8% и менее) в ИМ у курящих.

Для подтверждения возможности использования количества нейтрофилов и макрофагов в ИМ в качестве тестов, прогнозирующих развитие ХОБЛ было проведено исследование связей этих показателей с клиническими, биохимическими и спирометрическими показателями при ХОБЛ и спирометрическими показателями у здоровых курящих.

Таблица 2

Частота встречаемости доминирующих значений количества нейтрофилов и макрофагов в ИМ при ХОБЛ у здоровых курящих и здоровых некурящих

Клетки в индуцированной мокроте	Курящие, 35,1± 2,1 пачка/лет, n=26		Курящие, 10,4 ± 0,7 пачка/лет, n=45		Некурящие, n=13		ХОБЛ, стабильная фаза, n=80		P
	1		2		3		4		
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
Нейтрофилы ИМ 85% и более	4	15,4	8	17,8	5	38,4	53	66,3	P ₁₋₄ < 0,00001 P ₂₋₄ <0,00001 P ₃₋₄ >0,05
Макрофаги ИМ 8 % и менее	2	7,7	5	11,1	6	46,5	57	71,3	P ₁₋₄ < 0,00001 P ₂₋₄ <0,00001 P ₃₋₄ =0,003

Таблица 3

Чувствительность, специфичность и прогностические значения обнаружения более 85% нейтрофилов и менее 8% макрофагов в индуцированной мокроте у здоровых курящих для выявления риска ХОБЛ

Показатели	Более 85% нейтрофилов в ИМ	Менее 8% макрофагов в ИМ
Чувствительность	66%	71,3%
Специфичность	83%	90,1%
Положительное прогностическое значение	81,5%	89,06%
Отрицательное прогностическое значение	68,6%	73,6%
Значимость теста	3,92	7,2

При ХОБЛ количество макрофагов и нейтрофилов в ИМ соотносилось прямыми и обратными связями с клиническими проявлениями болезни (кашель, количество отделяемой мокроты, дистанцией, проходимой в тесте с 6-мин. ходьбой), с морфологическим состоянием эпителия бронхов (метаплазия, количество цилиндрического эпителия), с количеством веществ в ИМ, относящихся к протеиназ/антипротеиназной и оксидант/антиоксидантной системам.

Исследование соотношений содержания нейтрофилов и макрофагов в ИМ с данными спирометрии у здоровых курящих с разным стажем курения показало средние и сильные корреляции с вентиляционными показателями. Также отчетливо прослеживалась прямая связь с содержанием макрофагов и отрицательная – с количеством нейтрофилов (табл. 4).

Учитывая ведущую роль нейтрофилов в развитии ХОБЛ, далее исследовались цитохимические характеристики этих клеток в бронхиальном регионе и кровяном русле (табл. 5).

Таблица 4

Корреляции количества нейтрофилов и макрофагов в ИМ со спирометрическими показателями у курящих с анамнезом курения $35,1 \pm 2,1$ пачка/лет ($n=25$)

Пары анализируемых показателей	r	p
Нейтрофилы (количество, %) ↔ ФЖЕЛ/ОФВ ₁	-0,55	0,004
Нейтрофилы (количество, %) ↔ МОС 75	-0,75	0,00002
Нейтрофилы (количество, %) ↔ МОС50	-0,42	0,037
Нейтрофилы (количество, %) ↔ МОС 25/75	-0,53	0,007
Макрофаги (количество, %) ↔ ФЖЕЛ/ОФВ ₁	0,45	0,023
Макрофаги (количество, %) ↔ МОС 75	0,80	0,00002
Макрофаги (количество, %) ↔ МОС 50	0,44	0,026
Макрофаги (количество, %) ↔ МОС 25/75	0,58	0,0024

Таблица 5

Цитохимические свойства нейтрофилов крови и индуцированной мокроты у здоровых курящих, некурящих и при ХОБЛ (ед. опт. пл.)

Фотометрический показатель	Курящие, $35,1 \pm 2,1$ пачка/лет		Курящие, $10,4 \pm 0,7$ пачка/лет		Некурящие		ХОБЛ, стабильная фаза		P
	1		2		3		4		
	n	M±m	n	M±m	n	M±m	n	M±m	
Нейтрофилы индуцированной мокроты									
Миелопероксидаза	23	$83,1 \pm 4,8$	57	$88,2 \pm 3,2$	18	$94,3 \pm 5,4$	66	$108,1 \pm 3,6$	$P_{1,2-4} < 0,001$ $P_{3-4} < 0,01$
Катионные протеины	26	$73,34 \pm 3,1$	54	$77,50 \pm 3,08$	16	$78,40 \pm 2,87$	73	$112,6 \pm 2,37$	$P_{1,2,3-4} < 0,001$
Нейтрофилы крови									
Миелопероксидаза	27	$120,6 \pm 10,4$	71	$134,23 \pm 4,83$	27	$134,94 \pm 7,16$	66	$104,8 \pm 5,4$	$P_{1,2,3-4} < 0,001$
Катионные протеины	29	$111,6 \pm 4,7$	67	$119,4 \pm 3,04$	29	$111,1 \pm 5,7$	72	$141,04 \pm 1,5$	$P_{1,2,3-4} < 0,001$

Статистически значимые различия выявлены в отношении содержания МП и КП, как в нейтрофилах ИМ, так и в нейтрофилах крови. Высокий уровень значимости этих различий позволил использовать эти цитохимические характеристики нейтрофилов для дальнейшего исследования в качестве критериев, про

гнозирующих развитие ХОБЛ у курящих. Для этого были идентифицированы доминирующие значения при ХОБЛ. Для МП пороговое значение составило 105,0 ед. и более в ИМ, 99,4 ед. и менее – в крови, для катионных протеинов – 100 ед. и более в нейтрофилах ИМ и 139,0 ед. и более в нейтрофилах крови. Частота этого уровня указанных показателей, во всех группах обследованных приведена в таблице 6.

Таким образом, при ХОБЛ среднее содержание МП и КП в нейтрофилах крови было больше, чем у здоровых всех сравниваемых групп. В нейтрофилах ИМ было обратное соотношение – при ХОБЛ концентрация этих веществ клетках была ниже, чем у здоровых курящих и некурящих. Можно предположить, что при ХОБЛ формируется пул нейтрофилов с высокой продукцией веществ (МП и КП), что наблюдается в крови. Меньшее количество МП и КП в нейтрофилах ИМ можно объяснить тем, что при ХОБЛ в тканях происходит выраженная активация нейтрофилов с высвобождением этих продуктов из клеток. Были определены чувствительность, специфичность и прогностические значения использования параметров МП и КП в нейтрофилах ИМ в качестве тестов, прогнозирующих развитие ХОБЛ (табл. 7).

Во всех исследуемых группах прогностические показатели и значимость теста определения содержания МП в нейтрофилах ИМ оказались примерно одинаковыми и относительно невысокими, а содержание КП в нейтрофилах ИМ выявило высокий уровень прогностических характеристик этого показателя.

Участие нейтрофилов с исследуемыми цитохимическими характеристиками в генезе ХОБЛ подтверждается установленными статистически значимыми соотношениями с клиническими характеристиками ХОБЛ. В частности, на это указывают связи концентрации КП и МП в нейтрофилах крови и мокроты с клиническим индексом тяжести болезни, дистанцией в тесте с 6-мин. ходьбой, степенью одышки и др. Большой концентрации МП и КП в нейтрофилах крови и меньшей концентрации этих веществ в нейтрофилах ИМ соответствуют значения показателей, характеризующих клинику ХОБЛ: более высокий клинический индекс тяжести болезни, меньшая дистанция в тесте с 6 мин. ходьбой, меньшая сатурация кислорода.

Содержание МП и КП в нейтрофилах крови продемонстрировали относительно невысокую прогностическую значимость.

У здоровых курящих и у никогда некурящих корреляционный анализ также указывает на связь количества миелопероксидазы и катионных протеинов в нейтрофилах индуцированной мокроты и крови с характеристиками аппарата внешнего дыхания.

Таблица 6

Частота встречаемости показателей содержания МП и КП в нейтрофилах крови и мокроты у здоровых курящих, соответствующих доминирующим значениям при ХОБЛ

Пороговое значение показателя в нейтрофилах ИМ и крови в единицах оптической плотности	Курящие, анамнез курения 35,1 ± 2,1 пачка/лет		Курящие, анамнез курения (10,4±0,7 пачка/лет)		Некурящие		ХОБЛ, стабильная фаза		P
	1		2		3		4		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
МП в нейтрофилах ИМ (105,0 ед. опт. пл. и более)	5 (из 23)	21,7	14 (из 57)	24,6	3 (из 18)	16,7	33 (из 66)	50,0	P ₁₋₄ = 0,034 P ₂₋₄ = 0,007 P ₃₋₄ = 0,024
КП в нейтрофилах ИМ (100,0 ед. опт. пл. и более)	1 (из 27)	3,7	5 (из 54)	9,25	0 из 18	0	52 из 73	71,2	P ₁₋₄ < 0,0001 P ₂₋₄ <0,0001
МП в нейтрофилах крови (99,4 ед. опт. пл. и менее)	10 (из 27)	37,0	17 (из 71)	23,9	4 (из 27)	14,8	40 из 61	65,6	P ₁₋₄ =0,024 P ₂₋₄ <0,00001 P ₃₋₄ <0,00001
КП в нейтрофилах крови (139,0 ед. опт. пл. и более)	8 (из 29)	27,6	16 (из 67)	23,9	6 (из 29)	17,2	45 из 72	62,5	P ₁₋₄ =0,031 P ₂₋₄ <0,00001 P ₃₋₄ =0,0003

Таблица 7

Чувствительность, специфичность и прогностические значения обнаружения МП в значении 105,0 единиц оптической плотности и более и КП в значении 100 единиц оптической плотности и более в нейтрофилах ИМ у здоровых (курящих и некурящих) для выявления риска ХОБЛ

Показатели	МП 105,0 ед. опт. плотности и более	КП 100 ед. опт. плотности и более
Чувствительность	50%	71,2%
Специфичность	78%	93,95%
Положительное прогностическое значение	81,5%	89,6%
Отрицательное прогностическое значение	76,3%	81,6%
Значимость теста	2,27	11,8

Таким образом, была исследована возможность использования таких цитохимических характеристик нейтрофилов крови и ИМ, как содержание МП и КП в качестве тестов, определяющих риск развития ХОБЛ у курящих. И получена наибольшая прогностическая значимость при определении уровня катионных протеинов в нейтрофилах индуцированной мокроты.

Исследование показателей протеиназ/антипротеиназной, оксидант/антиоксидантной, калликреин-кининовой систем в бронхиальном регионе у здоровых курящих в качестве тестов, определяющих риск развития ХОБЛ у курящих

В таблице 8 приведено сравнение показателей, характеризующих протеиназ/антипротеиназную, оксидант/антиоксидантную, калликреин-кининовую системы в ИМ у курящих и при ХОБЛ в стабильную фазу. Оказалось, что при ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими в ИМ ниже активность протеиназных ингибиторов: α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина, кислотостабильных ингибиторов, а также каталазы. При ХОБЛ по сравнению со здоровыми выше активность ТПП, калликреина, калликреиногена, малонового диальдегида. Для дальнейшего анализа были выбраны 4 показателя: α_1 -ПИ, α_2 -МГ, ТПП, и КСИ.

Таблица 8

Показатели протеиназ/антипротеиназной, оксидант/антиоксидантной, калликреин-кининовой систем в ИМ у здоровых курящих и при ХОБЛ в стабильную фазу (M \pm m)

Показатели	n	Курящие (здоровые)	n	ХОБЛ	p
α_1 -протеиназный ингибитор (ИЕ/мл)	28	333,9 \pm 42,6	46	74,9 \pm 4,9	0,00001
α_2 -макроглобулин (ИЕ/мл)	28	77,61 \pm 7,05	46	16,6 \pm 1,8	0,00001
Эластаза (нмольБАНЭ/мин мл)	28	0,62 \pm 0,01	46	0,98 \pm 0,16	0,34
Трипсиноподобные протеиназы (нмольБАНЭ/мин мл)	28	1,9 \pm 0,3	52	3,4 \pm 0,22	0,00005
Кислотостабильные ингибиторы (МИЕ/мл)	28	25,25 \pm 2,27	46	17,62 \pm 1,43	0,008
Калликреин (мЕ/мл)	11	8,47 \pm 0,65	40	21,94 \pm 1,24	0,00001
Калликреиноген (мЕ/мл)	11	30,41 \pm 1,73	40	46,86 \pm 2,52	0,00013
Каталаза (мккатал/л)	11	129,58 \pm 26,5	39	65,59 \pm 6,49	0,03
Супероксиддисмутаза (Ед/мл)	11	10,58 \pm 1,09	39	10,32 \pm 0,6	0,9
Малоновый диальдегид (ммоль/мл)	11	0,85 \pm 0,23	40	3,37 \pm 0,32	0,00001

Была определена частота встречаемости у здоровых курящих доминирующих при ХОБЛ значений исследуемого фактора (табл. 9).

На основании этих данных, для каждого изучаемого биомаркера были определены чувствительность, специфичность и прогностические показатели (табл. 10).

Таблица 9

Частоты значений показателей протеиназ/антипротеиназной и оксидант/антиоксидантной систем у здоровых курящих, соответствующие доминирующим значениям при ХОБЛ

Показатели	n	Курящие		n	ХОБЛ		p
		Абс. кол-во	%		Абс. кол-во	%	
α_1 -протеиназный ингибитор (80,0 ИЕ/мл и менее)	28	4	14,3%	46	39	84,8%	0,00001
α_2 -макроглобулин (19 ИЕ/мл и менее)	28	3	10,7%	46	40	87,0%	0,00001
Трипсиноподобные протеиназы (3,0 нмольБАНЭ/мин мл и более)	28	4	14,3%	52	29	55,8%	0,0008
Кислотостабильные ингибиторы (19 мИЕ/мл и менее)	28	4	14,3%	46	28	60,9%	0,0002

Таблица 10

Чувствительность, специфичность и прогностические значения обнаружения биохимических показателей ИМ у здоровых курящих для выявления риска ХОБЛ

Биохимические показатели в индуцированной мокроте	α_1 -протеиназный ингибитор 100,0 ИЕ/мл и менее	α_2 -макроглобулин 19 ИЕ/мл и менее	Трипсиноподобные протеиназы 3,0 нмоль БАНЭ/мин мл и более	Кислотостабильные ингибиторы 19 мИЕ/мл и менее
Чувствительность	85%	87%	56%	61%
Специфичность	86%	89%	86%	86%
Положительное прогностическое значение	90,7%	93%	87,9%	87,5%
Отрицательное прогностическое значение	77,4%	80,6%	51,1%	56,8%
Значимость теста	6,07	7,91	4,0	4,36

Наиболее значимые показатели, характеризующие чувствительность, специфичность и прогностические значения были получены в отношении активности α_2 -макроглобулина и α_1 -протеиназного ингибитора.

С целью определения участия исследованных биомаркеров воспаления в генезе ХОБЛ изучена их связь с клиническими и спирометрическими показателями, определяющими клиническую характеристику ХОБЛ (табл. 11).

Корреляционный анализ показал, что клинические проявления ХОБЛ и спирометрические данные находятся в прямой связи с протеиназными ингибиторами. Чем больше этих продуктов в ИМ, тем лучше показатели, характеризующие клинику болезни и вентиляцию легких. Вещества, инициирующие и поддерживающие воспаление и увеличивающие деструктивный потенциал в бронхиальном регионе, такие как каликреин-кининовая система, эластаза,

трипсиноподобные протеиназы прямо коррелировали с отрицательными характеристиками болезни.

Представляло интерес исследование соотношений исследуемых биомаркеров с функцией внешнего дыхания у курящих. В таблице 12 приводятся данные корреляционного анализа показателей протеиназ-антипротеиназной системы в ИМ с вентиляцией легких у здоровых курящих.

Таблица 11

Корреляции концентрации веществ протеиназ-антипротеиназной системы в индуцированной мокроте с клиническими и вентиляционными характеристиками при ХОБЛ

Пары анализируемых показателей	n	r	P
Количество мокроты ↔ активность трипсиноподобных протеиназ	49	0,36	0,01
Одышка ↔ активность α_2 - макроглобулина	43	-0,37	0,01
Одышка ↔ активность трипсиноподобных протеиназ	49	0,45	0,001
Приступы удушья ↔ α_1 -протеиназного ингибитора	33	-0,43	0,01
Выслушиваемые высокие хрипы ↔ α_1 -протеиназный ингибитор	43	-0,36	0,018
Выслушиваемые высокие хрипы ↔ активность α_2 - макроглобулина	43	-0,34	0,025
Клинический индекс ↔ активность α_1 -протеиназного ингибитора	43	-0,37	0,014
Клинический индекс ↔ активность α_2 - макроглобулина	43	-0,40	0,007
Клинический индекс ↔ активность трипсиноподобных протеиназ	48	0,29	0,044
ЖЕЛ ↔ активность α_1 -протеиназного ингибитора	36	0,56	0,0004
ЖЕЛ ↔ активность α_2 - макроглобулина	36	0,37	0,027
ЖЕЛ ↔ активность кислотостабильных ингибиторов	36	-0,34	0,046
ФЖЕЛ ↔ активность α_1 -протеиназного ингибитора	36	0,57	0,0003
ФЖЕЛ ↔ активность α_2 - макроглобулина	36	0,36	0,032
ФЖЕЛ ↔ активность эластазы	36	-0,34	0,042
ОФВ ₁ ↔ активность α_1 -протеиназного ингибитора	36	0,53	0,001
ОФВ ₁ ↔ активность α_2 - макроглобулина	36	0,40	0,016
ОФВ ₁ ↔ активность эластазы	36	-0,39	0,018
ОФВ ₁ ↔ активность трипсиноподобных протеиназ	41	-0,4	0,01
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ ↔ активность трипсиноподобных протеиназ	41	-0,40	0,009

Таблица 12

Корреляции концентрации веществ протеиназ-антипротеиназной системы в ИМ с вентиляционными характеристиками у здоровых курящих

Пары анализируемых показателей	n	r	P
ПС вдоха ↔ активность трипсиноподобных протеиназ	27	-0,46	0,015
ФЖЕЛ ↔ активность эластазы	21	-0,44	0,046
ФЖЕЛ ↔ активность трипсиноподобных протеиназ	21	-0,44	0,045
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ ↔ активность α_2 - макроглобулина	21	0,45	0,043
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ ↔ активность α_1 - протеиназного ингибитора	21	0,44	0,02
МОС 50 ↔ активность α_2 - макроглобулина	21	0,53	0,014
МОС 25/75 ↔ активность α_2 - макроглобулина	21	0,46	0,035
МОС 25/75 ↔ α_1 - протеиназный ингибитор	21	0,45	0,014

Полученные данные демонстрируют связь показателей концентрации веществ протеиназ/антипротеиназной, оксидант/антиоксидантной и калликреин-

кининовой систем в индуцированной мокроте с вентиляционными и функциональными характеристиками у здоровых курящих. В основном, это корреляции средней интенсивности. Как и при ХОБЛ, у здоровых курящих большему содержанию антипротеиназных, антиоксидантных факторов соответствовали более высокие скоростные показатели вентиляции легких. Этот механизм сдерживает переход болезни в клинически определяемую форму. В случае же снижения антипротеиназных факторов, вероятность развития клинически выраженной ХОБЛ возрастает. С этих позиций факт снижения активности антипротеиназных систем у курящих подтверждает прогностическую значимость этих показателей.

Таким образом, исследование протеиназ-антипротеиназной, оксидант-антиоксидантной и калликреин-кининовой систем в ИМ у здоровых курящих показало, что определенные концентрации α_2 -макроглобулина, α_1 -протеиназного ингибитора и трипсинподобных протеиназ могут рассматриваться в качестве маркеров для определения риска развития ХОБЛ у курящих.

Исследование цитологических, цитохимических показателей в отпечатке «кожного окна» в качестве тестов, определяющих риск развития ХОБЛ у курящих.

В последнее время появилась серия работ, доказывающих системность воспалительной реакции при ХОБЛ (E.F. Wouters, E.C. Creutzberg, 2002, 2005; S. Hodge, 2005; I. K. Demedts, 2006; K. F. Chung, 2008). С этих позиций представляет интерес оценка клеточных механизмов воспалительной реакции вне бронхолегочного региона. Для этого мы использовали метод «кожного окна», дополненный нами оценкой апоптоза нейтрофилов. Исходя из многочисленных исследований о демонстративности оценки функциональной полноценности клеток воспалительного инфильтрата при различных патологических состояниях, созданного методом «кожного окна», эта технология была включена в программу поиска предикторов развития ХОБЛ у курящих.

Сравнение средних значений выявило ряд различий в цитологической характеристике отпечатков «кожного окна» при ХОБЛ и у здоровых курящих. Различия в большей степени относились ко второй фазе воспалительного процесса в «кожном окне» (табл. 13). Для дальнейшего анализа показателей «кожного окна» в качестве теста, определяющего риск ХОБЛ у курящих, был определен показатель «количество нейтрофилов с признаками апоптоза», выраженный в процентах, наблюдаемый через 24 часа после скарификации.

Следующим этапом нашего исследования было определение доминирующего значения выбранного показателя при ХОБЛ. Доминирующее значение количества апоптотически измененных нейтрофилов в «кожном окне» через 24 часа при ХОБЛ оказалось величиной «8% и более», исходя из среднего количества этих клеток – 10,5% с вычитанием ошибки средней – 2,4%. Дополнение «и более» обусловлено направленностью изменений этой величины при ХОБЛ – возрастанием числа нейтрофилов с признаками апоптоза по сравнению со здоровыми курящими и некурящими. Вместе с тем есть мнение, что для контролируемого воспалительного процесса характерно либо отсутствие нейтрофилов с

признаками апоптоза в очаге, либо их количество не превышает 2% от общего числа нейтрофилов (К. Morimoto, 2006).

Исходя из этого, нами был проведен анализ частоты встречаемости этого показателя во всех сравниваемых группах как по доминирующему значению апоптоза, то есть «8% и более», так и по значению «2% и более». Кроме того, исходя из утверждения ряда исследователей, что при нормальном течении воспаления апоптозных нейтрофилов не наблюдали, нами проведен анализ частоты встречаемости апоптоза вне зависимости от его величины, то есть анализировался альтернативный признак «наблюдался апоптоз нейтрофилов» и «не наблюдался». Такая градация анализа позволила определить тест с наибольшими критериями чувствительности, специфичности и прогностических значений.

При ХОБЛ нейтрофилы с признаками апоптоза в «кожном окне» через 24 часа после скарификации были обнаружены у 81% пациентов, у здоровых курящих значительно реже – в 25% - 42,8% случаях ($p=0,0001$).

Анализ частоты встречаемости апоптоза нейтрофилов в «кожном окне», превышающее 2% от общего количества этих клеток в отпечатке, демонстрирует высокую разницу между здоровыми курящими (17,4%) и больными (69,0%), по сравнению с показателем обнаружения апоптоза независимо от его величины, что делает этот тест более значимым в отношении прогноза ХОБЛ у курящих.

Таблица 13

Цитометрические показатели отпечатка «кожного окна» у курящих, некурящих и при ХОБЛ через 24 часа после скарификации ($M \pm m$)

Показатель	Курящие, 35,1 ± 2,1 пачка/лет (n=28)	Курящие, 10,4 ± 0,7 пачка/лет (n=64)	Некуря- щие (n=24)	ХОБЛ, ста- бильная фа- за (n=42)	p
	1	2	3	4	
Нейтрофилы с при- знаками апоптоза (%)	3,6 ± 1,56	1,78 ± 0,5	1,88 ± 0,81	10,5 ± 2,36	$p_{1-4}= 0,0003$ $p_{2-4}= 0,00001$ $p_{3-4}= 0,00008$
Нейтрофилы с при- знаками некроза (баллы)	0,38 ± 0,12	0,4 ± 0,07	0,4 ± 0,1	0,73 ± 0,08	$p_{1-4}= 0,002$ $p_{2-4}=0,0008$ $p_{3-4}=0,017$

У здоровых, никогда некурящих также обнаруживается более 2% нейтрофилов с признаками апоптоза в КО в 16,7%. У курящих с длительным анамнезом курения частота встречаемости такого количества апоптозных нейтрофилов несколько выше – 21,4%. Показатели чувствительности, специфичности, прогноза в отношении развития ХОБЛ для теста, определяющего апоптоз «2% и более» в КО значительно выше по отношению к аналогичным показателям с определением других количеств нейтрофилов с признаками апоптоза (табл.14). Анализ апоптоза нейтрофилов «8% и более» в КО показал низкую чувствительность данного теста.

Таким образом, наиболее значимой величиной апоптоза нейтрофилов в КО является критерий «2% и более». Далее были исследованы связи всех цитологических показателей КО и показателей вентиляции легких, с помощью непараметрического корреляционного анализа. Из всех цитологических критериев КО связь выявлена только между показателями вентиляции легких и количеством апоптозных нейтрофилов (табл. 15).

Таблица 14

Чувствительность, специфичность и прогностические значения обнаружения апоптоза нейтрофилов (более 2%) в тесте «кожного окна» через 24 часа после скарификации для выявления риска ХОБЛ у здоровых никогда некурящих и у курящих с анамнезом курения $18,4 \pm 1,3$ и $35,1 \pm 2,1$ пачка/лет

Показатели	Здоровые некурящие	Здоровые курящие $18,4 \pm 1,3$ пачка/лет)	Здоровые курящие, $35,1 \pm 2,1$ пачка/лет
Чувствительность	69%	69%	69%
Специфичность	83%	83%	79%
Положительное прогностическое значение	87,9%	64,4%	82,9%
Отрицательное прогностическое значение	60,6%	85,4%	62,9%
Значимость теста	4,06	4,06	3,29

Вентиляционные показатели у длительно курящих ($35,1 \pm 2,1$ пачка/лет) находятся в обратной зависимости от количества нейтрофилов с признаками апоптоза.

Таблица 15

Корреляции цитологических показателей в отпечатке «кожного окна» через 24 часа после скарификации с вентиляционными показателями у курящих с анамнезом курения $35,1 \pm 2,1$ пачка/лет (n=27)

Пары анализируемых показателей	r	p
Нейтрофилы с признаками апоптоза ↔ ФЖЕЛ	-0,46	0,016
Нейтрофилы с признаками апоптоза ↔ ОФВ ₁	-0,52	0,005
Нейтрофилы с признаками апоптоза ↔ ПС выдоха	-0,43	0,026
Нейтрофилы с признаками апоптоза ↔ МОС 25	-0,51	0,007
Нейтрофилы с признаками апоптоза ↔ МОС 25-75	-0,42	0,031
Нейтрофилы с признаками апоптоза ↔ ПС вдоха	-0,40	0,04

Таким образом, из 61 исследованного биомаркера воспаления, одиннадцать продемонстрировали возможность использования их в качестве тестов, прогнозирующих формирование ХОБЛ у курящих. Наиболее высокие уровни прогностической значимости определены для показателей, характеризующих количество катионных протеинов в нейтрофилах ИМ, активность антипротеиназной системы в индуцированной мокроте, количества нейтрофилов и макрофагов в ИМ.

Выводы

1. Высокий риск формирования ХОБЛ у курящих идентифицируются со следующими биомаркерами воспаления и их количественными значениями:
 - содержание катионных протеинов в нейтрофилах индуцированной мокроты в значении 100 оптических ед. плотности и выше,
 - активность α_2 -макроглобулина в индуцированной мокроте в значении 19 ИЕ/мл и менее,
 - количество макрофагов в индуцированной мокроте в значении 8% и менее,
 - активность α_1 -протеиназного ингибитора в индуцированной мокроте в значении 100 ИЕ/мл и менее.
2. Количество катионных протеинов в нейтрофилах, активность α_2 -макроглобулина, α_1 -протеиназного ингибитора, количество макрофагов в индуцированной мокроте, при указанных выше значениях, характеризуются следующими показателями прогностической значимости риска развития ХОБЛ у курящих: чувствительность – 87–71%, специфичность – 94–86%, положительное прогностическое значение – 90–93%, отрицательное прогностическое значение – 74–82%, шанс болезни при положительном тесте – 7,0–13,0; показатель значимости тестов – 6,07–11,8.
3. Биомаркеры воспаления, идентифицированные с риском развития ХОБЛ у здоровых курящих: количество макрофагов и нейтрофилов в индуцированной мокроте, активность α_1 -протеиназного и кислотостабильных ингибиторов, α_2 -макроглобулина, трипсиноподобных протеиназ в индуцированной мокроте, количество апоптотически измененных нейтрофилов в «кожном окне», содержание катионных протеинов, активность миелопероксидазы в нейтрофилах крови и индуцированной мокроте у больных ХОБЛ, коррелируют с клиническими характеристиками болезни.
4. Биомаркеры воспаления у практически здоровых курящих, ассоциированные с риском развития ХОБЛ: количество нейтрофилов в индуцированной мокроте, количество апоптотических нейтрофилов в «кожном окне», содержание катионных протеинов, активность миелопероксидазы в нейтрофилах крови и индуцированной мокроты, соотносятся отрицательными корреляциями с основными диагностическими критериями ХОБЛ – показателями, характеризующими скорость воздушного потока в бронхах.
5. У практически здоровых курящих скоростные показатели воздушного потока в бронхах положительно коррелируют с количеством макрофагов, активностью α_1 -протеиназного и α_2 -макроглобулина в индуцированной мокроте, что позволяет рассматривать эти биомаркеры воспаления в качестве вероятных факторов толерантности к развитию ХОБЛ.

Практические рекомендации

1. Для определения риска формирования ХОБЛ у курящих рекомендовано исследование следующих биомаркеров воспаления в индуцированной мокроте: содержание катионных протеинов в нейтрофилах, активность α_2 -макроглобулина, количество макрофагов, активность α_1 -протеиназного ингибитора.
2. Факторами риска развития ХОБЛ у курящих являются:
 - содержание катионных протеинов в нейтрофилах индуцированной мокроты в значении 100 оптических ед. плотности и выше,
 - активность α_2 -макроглобулина в индуцированной мокроте в значении 19 ИЕ/мл и менее,
 - количество макрофагов в индуцированной мокроте в значении 8% и менее,
 - активность α_1 -протеиназного ингибитора в индуцированной мокроте в значении 100 ИЕ/мл и менее.
3. Лицам с выявленным риском развития ХОБЛ, рекомендуется проводить комплекс профилактических мероприятий, включающих организацию диспансерного наблюдения, прекращение курения и воздействия поллютантов, проведение мероприятий по предупреждению и своевременному лечению острых респираторных заболеваний, противогриппозную вакцинацию, осуществление контроля функции внешнего дыхания, лечение хронического необструктивного бронхита.

Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Миелопероксидазная активность нейтрофилов мокроты и крови при хронической обструктивной болезни легких на фоне лечения с применением регулятора энергетического обмена «янтарь-антитокс» / Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровская, В.А. Хазанов, Н.С. Ямкина, А.А. Будкова, И.Н. Печеркина, Г.Э. Черногорюк // Первый съезд терапевтов Сибири и Дальнего Востока: Сборник тезисов докладов, 6-8 декабря 2005 года, г. Новосибирск, «Авангард», 2005. – С. 112–113.
2. Хемотаксическая и миелопероксидазная активность нейтрофилов очага асептического воспаления при хронической обструктивной болезни легких и в группе высокого риска / М.С. Санжаровская, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, А.А. Будкова, И.Н. Печеркина, Е.П. Рослякова, М.А. Малеева, Г.Э. Черногорюк // Первый съезд терапевтов Сибири и Дальнего Востока: Сборник тезисов докладов, 6-8 декабря 2005 года, г. Новосибирск, «Авангард», 2005. – С. 636–637.
3. Активность миелопероксидазы нейтрофилов различных регионов при ХОБЛ и в группе высокого риска / Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина, А.А. Будкова, Е.П. Рослякова, Г.Э. Черногорюк // Пульмонология. 15 Национальный конгресс по болезням органов дыхания. 1-ый учредительный конгресс Евроазиатского респираторного общества: Сборник тезисов, Москва, 2005. – 832. – С. 225.
4. Активность эластазы и её ингибиторов в индуцированной мокроте при ХОБЛ / А.А. Будкова, О.Е. Акбашева, Е.П. Рослякова, Т.С. Овчинникова, М.С. Санжаровская, Н.В. Варвянская, И.Н. Печеркина, Н.С. Ямкина // Пульмонология. 15 Нацио-

- нальный конгресс по болезням органов дыхания. 1-ый учредительный конгресс Евроазиатского респираторного общества: Сборник тезисов, Москва, 2005. – 830. – С. 224.
5. Активность миелопероксидазы нейтрофилов очага асептического воспаления и индуцированной мокроты у больных тяжелой хронической обструктивной болезнью легких в сопоставлении с эффективностью терапии обострения / М.С. Санжаровская, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина, А.А. Будкова, Г.Э. Черногорюк // Естественное и гуманизм: Сборник научных работ. – Томск: Изд-во СГМУ, 2005. – Том 2. – № 4. – С. 98.
 6. Клиническая эффективность регулятора энергетического обмена «янтар-антитокс» в лечении обострения хронической обструктивной болезни легких / М.С. Санжаровская, В.А.Хазанов, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина, А.А. Будкова, Г.Э. Черногорюк // Естественное и гуманизм: Сборник научных работ. – Томск: Изд-во СГМУ, 2005. – Том 2. – № 4. – С. 85.
 7. Миелопероксидазная активность нейтрофилов различных регионов при хронической обструктивной болезни легких и в группе высокого риска / Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, М.С. Санжаровская, А.А. Будкова, И.Н. Печеркина, Е.П. Рослякова, М.А. Малеева, Г.Э. Черногорюк // Науки о человеке: материалы VII конгресса молодых ученых и специалистов / под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет. – 2006. – С. 4–5.
 8. Протеазы и их ингибиторы в индуцированной мокроте при хронической обструктивной болезни легких и в группе высокого риска / М.С. Санжаровская, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина, О.Е. Акбашева, Т.С. Овчинникова, М.А. Малеева, Г.Э. Черногорюк // Сборник трудов Томской областной клинической больницы, выпуск XIII / под ред. Б.Т. Серых. – Томск: изд-во ТПУ, 2006. – С. 113–117.
 9. Миелопероксидазная активность нейтрофилов различных регионов при хронической обструктивной болезни легких и в группе высокого риска / Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, М.С. Санжаровская, И.Н. Печеркина, А.А. Будкова, Г.Э. Черногорюк, Е.П. Рослякова, М.А. Малеева // Сборник трудов Томской областной клинической больницы, выпуск XIII / под ред. Б.Т. Серых. – Томск: изд-во ТПУ, 2006. – С.112–113.
 10. Clinical and functional characteristics of patients with acute severe COPD with or without ischemic heart disease / M. Sanzharovskaya, N. Varvyanskaya, N. Yamkina, I. Pecherkina, A. Budkova, E. Rosljakova, G. Chernogoryuk // *European Respiratory Journal*. – Vol. 28. – Suppl. 50. – Sempt. 2006. – S. 162.
 11. Relationship between proteases/anti-proteases system in induced sputum and spirometry testing in patients with chronic obstructive pulmonary disease / M. Sanzharovskaya, N. Varvyanskaya, N. Yamkina, I. Pecherkina, A. Budkova, E. Rosljakova, G. Chernogoryuk // *European Respiratory Journal*. – Vol. 28. – Suppl. 50 – Sempt. 2006. – S. 634.
 12. Связь миелопероксидазной активности нейтрофилов и клинических характеристик обострений хронической обструктивной болезни легких / С.В. Федосенко, Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина // Здоровье и образование в XXI веке: Материалы 7-й Международной научно-практической конференции, Москва, 2006. – С. 518.
 13. Сопряженность эффективности лечения обострений хронической обструктивной болезни легких с биомаркерами воспаления / Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина, Г.Э. Черногорюк, О.Е. Акбашева, А.А. Будкова, Е.П. Рослякова, А.А. Смотровая // Науки о человеке: материалы VIII конгресса молодых ученых и специалистов под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет. – 2007. – С.6–7.

14. Possible mechanisms of protection of lung tissue in smokers without COPD / M. Sanzharovskaya, G. Chernogoryuk, N. Varvyanskaya, N. Yamkina, I. Pecherkina // *European Respiratory Journal*. – 2007. – Vol. 30. – Suppl. 51. – P. 924.
15. Протеиназ-антипротеиназная система бронхиального региона и значение BODE-индекса при хронической обструктивной болезни легких / М.С. Санжаровская, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина, А.А. Будкова, О.Е. Акбашева, Е.П. Рослякова, Г.Э. Черногорюк // *Сборник трудов Томской областной клинической больницы/Под ред. Б.Т. Серых, Л.Г. Ленской: выпуск 14. – Томск, изд. ТПУ, 2007. – с. 50–51.*
16. Эффективность терапии обострений хронической обструктивной болезни легких и биомаркеры воспаления / Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина, О.Е. Акбашева, А.А. Смотровая, А.А. Будкова, Е.П. Рослякова, Г.Э. Черногорюк // *Уральский медицинский журнал*. – № 8. – 2007. – С. 17–20.
17. Способ определения активности миелопероксидазы в нейтрофилах и эозинофилах мокроты / Г.Э. Черногорюк, Е.П. Рослякова, И.Н. Печеркина, А.А. Будкова, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, М.С. Санжаровская // Патент на изобретение №2298183. – Бюллетень изобретений № 12. – 2007.
18. Способ определения продуктов цитохимической реакции, протекающей в нейтрофилах и эозинофилах мокроты под воздействием миелопероксидазы / Г.Э. Черногорюк, Е.П. Рослякова, И.Н. Печеркина, А.А. Будкова, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, М.С. Санжаровская // Патент на изобретение № 2298184. – Бюллетень изобретений № 12. – 2007.
19. Влияние длительного курения на функцию внешнего дыхания и протеиназ-антипротеиназную систему в бронхиальном регионе / А.А. Смотровая, М.С. Санжаровская, О.Е. Акбашева, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, А.В. Наумов, Е.П. Рослякова, И.Н. Печеркина, Г.Э. Черногорюк // *Здоровье и образование в XXI веке: Материалы 9-й Междунар. научн. – пр. конф». М., 2008. – С.452–453.*
20. Протеиназные ингибиторы как протективные механизмы развития ХОБЛ у курящих / А.А. Смотровая, Г.Э. Черногорюк, М.С. Санжаровская, Н.С. Ямкина, Н.В. Варвянская, О.Е. Акбашева, И.Н. Печеркина, М.В. Тупицын, А.В. Наумов // *Здоровье и образование в XXI веке: Материалы 9-й Междунар. научн.-пр. конф». М., 2008. – С.455.*
21. Влияние регулятора энергетического обмена на клиническое течение и биомаркеры воспаления при лечении обострений тяжелой хронической обструктивной болезни легких / М.С. Санжаровская, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина, А.А. Смотровая, С.И. Антипов, Е.П. Рослякова, О.Е. Акбашева, О.П. Санжаровская, В.А. Хазанов, Г.Э. Черногорюк // *Бюллетень сибирской медицины*. – № 3. – 2008. – С. 104–108.
22. Способ прогнозирования риска развития хронической обструктивной болезни легких у длительно курящих лиц / Г.Э. Черногорюк, А.А. Смотровая, Н.С. Ямкина, О.Е. Акбашева, М.С. Санжаровская, А.А. Михайлова, Е.П. Рослякова, И.Н. Печеркина, С.И. Антипов, Н.В. Варвянская // Патент на изобретение № 2359618. – Бюллетень изобретений № 18. - 2009.

Список сокращений

АМ – альвеолярные макрофаги	МДА – малоновый диальдегид
АФК – активные формы кислорода	ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты
ЖЕЛ – жизненная емкость легких	ПОЛ – перекисное окисление липидов
ВЭМ – велоэргометрия	ОФВ ₁ – объем форсированного выдоха за 1 сек
ИМ – индуцированная мокрота	ТПП – трипсиноподобные протеиназы
КГ – калликреиноген	ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких
КП – катионный протеин	ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

КК –	калликреин	α_1 .ПИ –	альфа 1 – протеиназный ингибитор
КО –	«кожное окно»	α_2 .МГ –	альфа 2 – макроглобулин
КСИ –	кислостабильные ингибиторы	GOLD –	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
МП –	миелопероксидаза	6MWD –	6 min walking distance , тест с 6-минутной ходьбой

