

На правах рукописи

ДЕМЕНТЬЕВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ЦИТО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ
ПРИ ОБОСТРЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ
ЛЕГКИХ НА ФОНЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ**

14.00.43 – пульмонология

14.00.16 – патологическая физиология

А в т о р е ф е р а т

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Томск – 2004

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском университете

Научные руководители:

кандидат медицинских наук **Букреева Екатерина Борисовна**
доктор биологических наук, профессор **Суханова Галина Алексеевна,**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Зарипова Татьяна Николаевна**
доктор медицинских наук, профессор **Уразова Ольга Ивановна**

Ведущая организация — Алтайский государственный медицинский университет (г. Барнаул).

Защита состоится «___» _____ 2004 г. в _____ час. на заседании диссертационного совета Д 208.096.02 Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан «___» _____ 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Тюкалова Л.И.

Актуальность работы. Хроническая обструктивная болезнь легких относится к числу наиболее распространенных заболеваний человека. В структуре заболеваемости она входит в число лидирующих по числу дней нетрудоспособности, причинам инвалидности и занимает четвертое место среди причин смертности. Как ожидается, это заболевание станет третьей по причине смерти в общей заболеваемости и пятой по причине инвалидности в мире к 2020 г. (Айсанов З.Р., Кокосов А.Н., Овчаренко С.И. и соавт., 2001; WHO workshop (GOLD), 2001; Барнес П.Д., 2003). Хроническая обструктивная болезнь лёгких у подавляющего большинства больных развивается постепенно, на протяжении многих лет под влиянием различных факторов риска. Среди них главную роль играют ингаляции табачного дыма при курении, частые респираторно-вирусные инфекции и экологический кризис (Новожёнов В.Г., Белоногов М.А., 1996; Овчаренко С.И., 2001; Кокосов А.Н., 2000). Одним из важнейших механизмов развития и прогрессирования хронической обструктивной болезни лёгких является воспаление, которое играет первичную роль в формировании всего комплекса патологических изменений (Ollerenshaw S.L., Woolcock A.J., 1992; Barnes P.J., 1995). Биомаркёрами этого воспаления, особенно в фазу обострения заболевания, являются нейтрофилы с высокой активностью миелопероксидазы, нейтрофильной эластазы (Чучалин А.Г., 2000; Hoidal J.R., Jeffery P.K., 1998; Barnes P.J., 2000).

Нейтрофильная эластаза участвует в разрушении ключевых компонентов тканевого матрикса, приводя, в конечном счёте, к формированию эмфиземы лёгкого (Janoff A., 1985; Stockley R.A., 1999). Основными регуляторами активности этого агрессивного фермента являются плазменные α_1 -протеиназный ингибитор и α_2 -макроглобулин, а также внесосудистые кислотостабильные ингибиторы, которые определяют антипротеолитическую активность бронхиального секрета (Оглоблина О.Г., 1982; Дубровин С.М., 2000; Веремеенко К.Н., 1988; Stockley R.A., 2000, 2002).

При взаимодействии протеолитических ферментов и их ингибиторов должно сохраняться определённое равновесие, которое нарушается при хронической обструктивной болезни лёгких из-за несовершенства эндогенных антипротеиназных механизмов (Barnes P.J., 2003; Stockley R.A., 2001). В литературе имеются данные об активности эластазы, кислотостабильных ингибиторов, α_1 -протеиназного ингибитора в бронхоальвеолярных смывах, плазме крови при различных бронхолёгочных заболеваниях (Веремеенко К.Н., 1971-1988; Stockley R.A. 2000, 2002; Макинский А.И. и соавт., 2000; Мурыгина Г.Л. и соавт., 2002; Оглоблина О.Г., 1982). Вместе с тем, данные об активности миелопероксидазы нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов в мокроте у больных хронической обструктивной болезнью лёгких практически отсутствуют, а сведения об этих показателях в крови при этом заболевании ограничены. Учитывая вышеизложенное, изучение биологических маркёров воспаления в крови и мокроте у больных хронической обструктивной болезнью лёгких весьма актуально, так как позволит выяснить диагностическую ценность каждого из них.

Важнейшим направлением исследований по проблеме хронической обструктивной болезни лёгких является поиск лекарственных средств, способных тормозить воспаление, лежащее в основе этого заболевания. В последние годы появился противовоспалительный препарат фенспирид, который по химическому строению и фармакологическим свойствам отличается от стероидных и нестероидных средств. Эффективность фенспирида при лечении хронической обструктивной болезни лёгких показана в ряде зарубежных и отечественных клинических исследований (Овчаренко С.И., 2001, Evard Y., Kato G. et al., 1991, Akoun G. Et al., 1991, Melloni B., 2002; Безлепко А.В., 2001). Исследование активности миелопероксидазы нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов в крови и мокроте при лечении этим препаратом позволит охарактеризовать эффективность его противовоспалительного действия у больных хронической обструктивной болезнью лёгких.

Цель исследования

Оценить активность миелопероксидазы нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов в крови и мокроте при обострении хронической обструктивной болезни лёгких, изучить влияние противовоспалительной терапии на клинические и цито-биохимические показатели.

Задачи исследования

1. Изучить активность миелопероксидазы нейтрофилов, эластазы, трипсиноподобных протеиназ, α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина и кислотостабильных ингибиторов в крови у больных хронической обструктивной болезнью лёгких.

2. Изучить показатели активности миелопероксидазы нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов в мокроте у больных хронической обструктивной болезнью лёгких.

3. Изучить влияние курения на активность миелопероксидазы нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов в крови и мокроте больных хронической обструктивной болезнью лёгких.

4. Изучить влияние инфекции на активность миелопероксидазы нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов в крови и мокроте больных с обострением хронической обструктивной болезни лёгких.

5. Выявить цито-биохимические показатели, являющиеся критериями эффективности лечения обострения хронической обструктивной болезни лёгких.

6. Провести сравнительный анализ эффективности терапии фенспиридом и ипратропиума бромидом обострения хронической обструктивной болезни лёгких.

Научная новизна

Впервые дана характеристика активности миелопероксидазы нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов в мокроте больных хронической обструктивной болезнью лёгких. Установлено, что в патогенезе обострения хронической обструктивной болезни лёгких существенное значение имеет повышение активности миелопероксидазы нейтрофилов, эластазы, трипсиноподобных протеиназ, α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина и снижение активности кислотостабильных ингибиторов мокроты. В крови активность миелопероксидазы нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов не изменяется. Показано, что курение у здоровых приводит к повышению активности трипсиноподобных протеиназ в плазме крови и мокроте, у больных хронической обструктивной болезнью лёгких сопровождается увеличением числа активных нейтрофилов, повышением активности трипсиноподобных протеиназ и снижением активности α_1 -протеиназного ингибитора в мокроте. Обострение хронической обструктивной болезни лёгких инфекционной этиологии приводит к повышению активности α_2 -макроглобулина в мокроте.

Выявлено, что определение активности миелопероксидазы нейтрофилов, эластазы, α_1 -протеиназного ингибитора и кислотостабильных ингибиторов в мокроте позволяет контролировать эффективность лечения больных с обострением хронической обструктивной болезнью лёгких, при этом установлено более выраженное действие противовоспалительного препарата фенспирида по сравнению с ипратропиума бромидом.

Теоретическая и практическая значимость

Изучена проблема взаимодействия протеиназ и их ингибиторов плазмы крови и мокроты больных хронической обструктивной болезнью лёгких. Важное значение для характеристики состояния больных имеют цито - биохимические показатели мокроты. Установлено, что обострение хронической обструктивной болезни лёгких сопровождается активацией нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов, участвующих в воспалительных и деструктивных процессах бронхолёгочной системы. Цитохимическое и биохимическое исследование мокроты у больных хронической обструктивной болезнью лёгких позволяют оценивать эффективность лечения обострения этого заболевания. При эффективной терапии обострения хронической обструктивной болезни лёгких уменьшается число активных нейтрофилов, активность эластазы, α_1 -протеиназного ингибитора, повышается активность кислотостабильных ингибиторов в мокроте. Полученные данные вносят вклад в понимание роли воспаления в патогенезе хронической обструктивной болезни лёгких и эффективности противовоспалительной терапии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При хронической обструктивной болезни лёгких наблюдаются существенные изменения цито-биохимических показателей в мокроте. Для обострения заболевания характерна высокая активность миелопероксидазы нейтрофилов мокроты, коррелирующая с выраженностью основных симптомов обострения заболевания. В мокроте больных повышена активность протеиназ и ингибиторов на фоне низкой активности кислотостабильных ингибиторов. У курящих больных хронической обструктивной болезнью лёгких активность α_1 -протеиназного ингибитора в мокроте снижена.

2. Активность миелопероксидазы нейтрофилов, эластазы, α_1 -протеиназного и кислотостабильных ингибиторов мокроты являются показателями эффективности лечения обострения хронической обструктивной болезни легких. После лечения происходит снижение активности миелопероксидазы нейтрофилов, эластазы, а также восстанавливается активность α_1 -протеиназного и кислотостабильных ингибиторов в мокроте больных.

3. Применение противовоспалительного препарата фенспирида при лечении обострения хронической обструктивной болезни лёгких способствует более выраженному, по сравнению со стандартной терапией, улучшению клинической картины, снижению активности миелопероксидазы нейтрофилов, эластазы, нормализации активности α_1 -протеиназного и кислотостабильных ингибиторов в мокроте.

Апробация диссертации

Основные материалы опубликованы в 21 печатной работе, доложены на IV международном конгрессе молодых учёных и специалистов «Науки о человеке», Томск, 15-16 мая 2003г., на XIII национальном конгрессе по пульмонологии в Санкт-Петербурге (2003), на Европейских респираторных конгрессах в Стокгольме (2002) и в Вене (2003).

Внедрение

Результаты исследования внедрены в практическую работу пульмонологического отделения городской больницы №3 г. Томска, в практическую деятельность ООО «Центр иммунопатологии» г. Томска, в учебный процесс кафедры иммунологии с аллергологией СибГМУ.

Объем и структура диссертации.

Работа изложена на 127 листах машинописного текста, состоит из введения, пяти глав, выводов, практических рекомендаций. Содержит 17 рисунков, 22 таблицы. Список литературы включает 48 отечественных и 99 зарубежных источников.

Диссертация выполнена на кафедре внутренних болезней педиатрического факультета Сибирского государственного медицинского университета, в пульмонологическом отделении городской больницы № 3 г. Томска, в лаборатории кафедры биохимии и молекулярной биологии, а также в центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор больных проводился в 2 этапа. На первом этапе с использованием скрининговых методов было обследовано 387 пациентов с жалобами на кашель или одышку. У 80 из этих пациентов было диагностировано обострение ХОБЛ. На втором этапе проводилось обследование 80 пациентов с обострением ХОБЛ и рандомизация методом «конвертов» в 2 группы по 40 человек. Из них наблюдалось в течение 3 месяцев 67 больных: 35 и 32 пациентов в обеих группах. Обследование и стационарное лечение проведено в течение в среднем $21,3 \pm 0,2$ дней. Далее этих пациентов наблюдали в амбулаторных условиях в течение 3 месяцев.

В группе Ф было 35 пациентов с обострением хронической обструктивной болезни лёгких, получавших фенспирид (Эреспал, фирмы Сервье, Франция) в суточной дозе 160 мг, по 80 мг 2 раза в день в течение 3 месяцев. Группу СТ составляло 32 больных с обострением хронической обструктивной болезни лёгких, получавших в качестве базисного препарата ипратропиума бромид (Атровент, фирмы Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ, Австрия) по 2 дозы аэрозоля 3 раза в день в течение 3 месяцев. Кроме этого, при ретроспективном анализе были выделены две группы пациентов: группа I, 53 человека, с хорошей положительной динамикой клинических симптомов на фоне лечения обострения хронической обструктивной болезни лёгких; группа II, 14 человек, у которых динамика симптомов заболевания менялась мало, либо оставалась прежней. Критерием разделения на такие группы служила балльная оценка симптомов заболевания.

Для контроля обследована группа здоровых добровольцев из 61 человека, не страдающих бронхолегочной патологией.

Возраст обследованных пациентов и здоровых людей в контрольной группе колебался от 41 до 78 лет (средний возраст $59,2 \pm 2,4$ года). Мужчин в группах исследования было 101 человек (81,76%), женщин 27 (18,24%). Среди больных с обострением хронической обструктивной болезнью лёгких 54 человека были курящими, из которых 9 прекратили курить в течение нескольких лет. Группа контроля набиралась таким образом, чтобы половину из неё составляли курящие. Среднее количество пачка/лет у курящих основной группы, группы сравнения и группы контроля было относительно равным ($41,7 \pm 6,6$, $42,3 \pm 6,3$ и $41,2 \pm 6,8$ пачка/лет, соответственно). Профессиональные вредности в анамнезе имели 52 пациента, из них 27 (77,14%) в группе Ф и 25 (78,13%) в группе СТ. Средняя длительность заболевания составила $13,3 \pm 1,4$

года. Диагноз хронической обструктивной болезни лёгких основывался на общепринятых критериях.

В исследование включали больных, у которых были симптомы обострения заболевания, объём форсированного выдоха за 1-ю секунду ($ОФВ_1$) составлял менее 80%, прирост $ОФВ_1$ после пробы с бронхолитиками (вентолин, беротек) был менее 15%. Инфекционная этиология обострения хронической обструктивной болезни лёгких была подтверждена с помощью количественного бактериологического исследования мокроты у 42 больных из них 22 пациента входили в группу Ф, а 20 - в группу СТ. У 25 пациентов этиология обострения заболевания осталась не выясненной, из них 13 человек наблюдались в основной группе, а 12 в группе сравнения.

В исследование не включались больные с тяжёлыми острыми или хроническими сопутствующими заболеваниями, а также пациенты, получавшие на момент начала работы ингаляционные или пероральные глюкокортикостероиды, эреспал. Информированное согласие пациента было обязательным.

При установке степени тяжести ХОБЛ мы руководствовались рекомендациями рабочей группы ВОЗ в соответствии с программой GOLD. Число больных с различной степенью тяжести в группах исследования было относительно равным. Для характеристики динамики клинических показателей применялась балльная оценка кашля, одышки, количества мокроты и хрипов. Балльная оценка кашля, количества, цвета и затруднения откашливания мокроты, выраженности одышки проводилась еженедельно, в течение 3 месяцев лечения по дневникам самонаблюдения пациентов. Такая оценка выраженности симптомов заболевания служила и критерием разделения наблюдаемых больных на группы I и II, в зависимости от наличия эффекта от лечения обострения заболевания. В группе I разница между суммой баллов до и после лечения была значительной и положительной, а в группе II – либо незначительной, либо равнялась 0.

Всем обследованным пациентам в период стационарного обследования по общепринятым методикам проводился общеклинический, биохимический анализ крови с исследованием общего белка, серомукоидов, С-реактивного белка. Также в обследование входило проведение электрокардиографии и выполнение фибробронхоскопии. Рентгенография органов грудной клетки проводилась при первичном обследовании больных, в дальнейшем по показаниям. Кроме этого, выполнялось количественное бактериологическое исследование мокроты с определением концентрации бактерий в 1 мл.

Оценка функции внешнего дыхания проводилась путем анализа кривой поток-объем и показателей спирометрии с использованием программного обеспечения SpiroVision II Spirometry System (USA) в начале и через три месяца лечения. Спирометрию анализировали по следующим показателям: форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объём форсированного выдоха за 1 секунду ($ОФВ_1$), отношение $ОФВ_1/ФЖЕЛ$ (индекс Тиффно), форсированный среднеэспираторный поток ($МОС_{25-75}$).

Цитохимическое определение активности миелопероксидазы нейтрофилов в мазках крови и мокроты осуществляли бензидиновым методом в начале исследования и через три месяца. Определяли процент положительно реагирующих нейтрофилов и рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) (Меньшиков В.В., 1987).

Активность эластазы, трипсиноподобных протеиназ определяли в плазме крови и мокроте, спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза N-бутил-оксикарбонил-L,D-аланин-p-нитрофенилового эфира (БАНЭ) и N-бензоил-L-аргинин этилового эфира (БАЭЭ) (Оглоблина О.Г. и соавт., 1984). Активность α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина и кислотостабильных ингибиторов также определяли в плазме крови и мокроте спектрофотометрически по торможению скорости гидролиза БАЭЭ трипсином (Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С., 1979; Оглоблина О.Г., 1984). Биохимическое исследование мокроты и плазмы крови проводили в основной группе и группе сравнения в начале исследования и через три месяца. Мокрота для биохимических исследований у здоровых добровольцев была получена путем ингаляции солевых растворов с помощью небулайзера.

Результаты обрабатывали методами вариационной статистики, а также методами непараметрической статистики (Боровиков В.П., 1998; Гланц С., 1999). Для описания средних величин использовали среднюю \pm ошибка средней ($\bar{X} \pm m$). Применяли также корреляционный анализ по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Считается, что большое значение в патогенезе хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ) имеет высокое содержание нейтрофилов в бронхах (Dallergi F., 1997; Барнес П.Дж., 2003). Функциональную активность нейтрофилов можно оценить косвенно, путём определения активности миелопероксидазы – фермента первичных гранул этих клеток. Активный нейтрофил выбрасывает ферменты своих гранул в окружающую среду, при этом ранее содержащаяся в них миелопероксидаза не восстанавливается, и в такой клетке реакция на миелопероксидазу либо отсутствует, либо слабо выражена (Хаитов Р.М. и соавт., 1995; Sybille Y., Merchandise F-X., 1995). Цитохимическое исследование крови показало, что у больных с обострением ХОБЛ число активных нейтрофилов выше, чем у здоровых лиц, но при этом значения СЦК не отличаются (табл. 1).

В легочную паренхиму и бронхи нейтрофилы проникают из циркуляторного русла под влиянием хемотаксических факторов. С этим связано то, что в мокроте у обследованных больных с обострением ХОБЛ было значительно больше, чем в крови активных нейтрофилов (табл. 1). Полученные данные отражают активность воспалительного процесса в бронхах. Число активных нейтрофилов в мокроте коррелировало с выраженностью кашля

($r=0,55$), что свидетельствует о роли таких нейтрофилов в патогенезе одного из основных симптомов этого заболевания.

Таблица 1

Активность миелопероксидазы нейтрофилов у здоровых и больных с хронической обструктивной болезнью легких, $\bar{X} \pm m$

Показатель		Кровь		Мокрота	P
		Здоровые, n=61	Больные ХОБЛ, n=67	Больные ХОБЛ, n=67	
Количество нейтрофилов с разной реакцией на миелопероксидазу,	с отрицательной, %	0	0,6±0,01	3,0±0,09	P ₁₋₂ <0,001 P ₂₋₃ <0,05
	со слабopоложительной, %	2,7±0,2	9,3±0,08	13,7±0,1	P ₁₋₂ <0,01 P ₂₋₃ <0,05
	с выраженной, %	85,2±0,9	79,9±0,1	50,6±0,2	P ₁₋₂ >0,05 P ₂₋₃ <0,05
	с резко выраженной, %	11,0±0,1	10,5±0,09	29,3±0,2	P ₁₋₂ >0,05 P ₂₋₃ <0,01
Средний цитохимический коэффициент		2,0±0,13	1,9±0,13	2,17±0,15	P ₁₋₂ >0,05 P ₂₋₃ >0,05

Примечание: p₁₋₂ – уровень значимости отличий между средними величинами в группах здоровых и больных ХОБЛ, p₂₋₃ – между средними величинами в крови и мокроте у больных ХОБЛ.

Известно, что курение оказывает прямое стимулирующее действие на продукцию нейтрофилов и выброс их из костного мозга, а также способствует миграции нейтрофилов в дистальные отделы бронхов (Барнес П.Дж., 2003; Чучалин А.Г., 2000), но данные о функциональном состоянии этих клеток противоречивы. В настоящей работе изучено влияние курения на активность нейтрофилов в крови и мокроте у больных ХОБЛ. Установлено, что в крови у курящих и некурящих больных ХОБЛ различий активности нейтрофилов нет. В мокроте у курящих больных ХОБЛ было значительно больше активных нейтрофилов (35±6,5%), чем у некурящих (8,22±2,74%). Полученные данные свидетельствуют о большей выраженности воспаления в бронхах у курящих пациентов по сравнению с некурящими.

При всём многообразии причин обострения ХОБЛ существенную роль играет инфекционный фактор. В связи с этим обоснованно выделять так называемые инфекционные обострения ХОБЛ. К данным, подтверждающим роль инфекции при обострении этого заболевания, относятся обнаружение этиологически значимого количества бактерий в 1 мл мокроты больных. Установлено, что при инфекционной этиологии обострения ХОБЛ изменяется активность только нейтрофилов мокроты. В мокроте пациентов отмечается

большее количество клеток с отсутствием реакции на миелопероксидазу ($5,71 \pm 3,17\%$) и меньшее число клеток со слабо выраженной реакцией на этот фермент ($10,53 \pm 3,19\%$), чем у больных с неясной этиологией обострения этого заболевания, у которых эти показатели были $0,20 \pm 0,20\%$ и $16,6 \pm 3,12\%$ соответственно.

Нейтрофилы обладают способностью индуцировать повреждение тканей путём выброса сериновых протеиназ (Sybille Y., 1993; De Backer W., 1998). С целью выяснения вопроса о взаимодействии протеиназ и их ингибиторов при ХОБЛ мы провели оценку их активности в плазме крови и мокроте у больных с обострением этого заболевания.

Установлено, что в плазме крови у больных и здоровых показатели активности протеиназ ингибиторов не отличаются (табл.2). Активность эластазы плазмы крови у больных с обострением ХОБЛ была в среднем на 40% выше, чем у здоровых. Отсутствие достоверных отличий обусловлено тем, что функция плотности распределения значений активности эластазы у здоровых была близка к нормальной, а у пациентов с обострением ХОБЛ имела бимодальный характер. Вместе с этим, в мокроте у больных, по сравнению со здоровыми была выше активность эластазы, трипсиноподобных протеиназ (ТПП), α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ), α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) и ниже активность кислотостабильных ингибиторов (КСИ)

Таблица 2

Активность протеиназ и ингибиторов в плазме крови и мокроте здоровых и больных с обострением ХОБЛ, $\bar{X} \pm m$.

Показатель	Здоровые, n=61	Больные ХОБЛ, n=67	P
Плазма крови			
Эластаза, нмоль/мин·мл	88,6±2,8	127,0±11,5	>0,05
Трипсиноподобная активность, нмоль/мин·мл	107,8±7,9	108,0±10,1	>0,05
α_1 -протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	25,2±2,1	28,6±3,3	>0,05
α_2 -макроглобулин, ИЕ/мл	3,52±0,05	3,65±0,2	>0,05
Кислотостабильные ингибиторы, мИЕ/мл	343,4±42,1	375,0±35,3	>0,05
Мокрота			
Эластаза, нмоль/мин·мл	0,19±0,03	0,91±0,1	<0,001
Трипсиноподобная активность, нмоль/мин·мл	0,44±0,05	4,51±1,6	<0,001
α_1 -протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	0,19±0,03	0,48±0,1	<0,01
α_2 -макроглобулин, ИЕ/мл	0,02±0,001	0,16±0,1	<0,001
Кислотостабильные ингибиторы, мИЕ/мл	10,13±1,7	4,39±0,4	<0,05

Высокая активность протеиназ в мокроте больных ХОБЛ свидетельствует об активации протеолиза в бронхиальной системе. Причиной низкой активности КСИ в мокроте, вероятно, является истощение эпителиальных клеток слизистых оболочек трахеи, бронхов, ответственных за 70-90% антипротеолитической активности бронхиального секрета человека (Оглоблина О.Г. и соавт., 1981, 1982). Корреляционный анализ показал, что активность эластазы в мокроте у больных ХОБЛ имеет прямую зависимость с выраженностью кашля ($r=0,42$) и количеством мокроты ($r=0,51$). Следовательно, активность эластазы в мокроте больше, чем другие показатели, отражает основные клинические симптомы воспалительного процесса в бронхах.

При изучении влияния курения на активность протеиназ и ингибиторов установлено, что у здоровых курящих активность ТПП в плазме крови и мокроте ($157,5 \pm 22,5$ нмоль/мин.мл и $0,55 \pm 0,07$ нмоль/мин.мл) была выше, чем у некурящих ($97,83 \pm 6,55$ нмоль/мин.мл и $0,31 \pm 0,05$ нмоль/мин.мл). У больных ХОБЛ при курении отмечалась высокая активность ТПП в мокроте ($5,30 \pm 2,30$ нмоль/мин.мл), по сравнению с некурящими пациентами ($2,71 \pm 0,79$ нмоль/мин.мл), а также более низкая активность α_1 -ПИ в мокроте ($0,36 \pm 0,06$ ИЕ/мл), чем у некурящих ($0,78 \pm 0,35$ ИЕ/мл). Высокая активность ТПП мокроты свидетельствует об активации протеолиза в бронхах. Снижение активности α_1 -ПИ в мокроте у курящих пациентов является, по-видимому, результатом инактивации этого фермента продуктами сгорания табака (Веремеенко К.Н., 1985; Cohen A.V., 1982).

Значительных изменений активности протеиназ и ингибиторов в плазме крови больных с инфекционной и неинфекционной этиологией обострения ХОБЛ не обнаружено. Однако в мокроте больных с инфекционной этиологией обострения заболевания была выше активность α_2 -МГ ($0,24 \pm 0,05$ ИЕ/мл), чем при неинфекционной этиологии обострения ХОБЛ ($0,03 \pm 0,009$ ИЕ/мл). Повышение активности α_2 -МГ в мокроте у пациентов с инфекционной этиологией обострения ХОБЛ возможно обусловлено повышенной трансудацией белков из крови во время воспаления в бронхах (Дубровин С.М., 2000).

Для того, чтобы решить вопрос, динамику каких показателей можно считать критериями эффективности применяемой терапии, проанализированы группы с наличием клинического эффекта (группа I) и с отсутствием такового (группа II). Критерием разделения на группы I и II служила балльная оценка симптомов заболевания. В группе I разница между суммой баллов до и после лечения была значительной и положительной, а в группе II – либо незначительной, либо отрицательной. В группе I было 53 пациента (79,1% всех больных с обострением ХОБЛ), в группе II – 14 пациентов (20,8%).

В активности нейтрофилов крови не выявлено различий между I и II группами пациентов, при этом СЦК после лечения составил $1,96 \pm 0,03$ в I группе и $2,03 \pm 0,03$ во II группе. Достоверные отличия имелись только в показателях активности миелопероксидазы нейтрофилов мокроты. При этом через три

месяца лечения в группе пациентов, имевших положительную динамику симптомов заболевания, уменьшалось количество активных нейтрофилов (рис. 1), а также достоверно повышалось значение СЦК в мокроте ($3,4 \pm 0,09$), по сравнению с больными, у которых не было клинического эффекта от лечения заболевания, у которых СЦК после лечения составлял $2,6 \pm 0,1$. В мокроте больных с наличием эффекта от лечения снижалась активность эластазы, α_1 -ПИ и повышалась активность КСИ (табл. 3), приближаясь к значениям показателей в группе контроля.

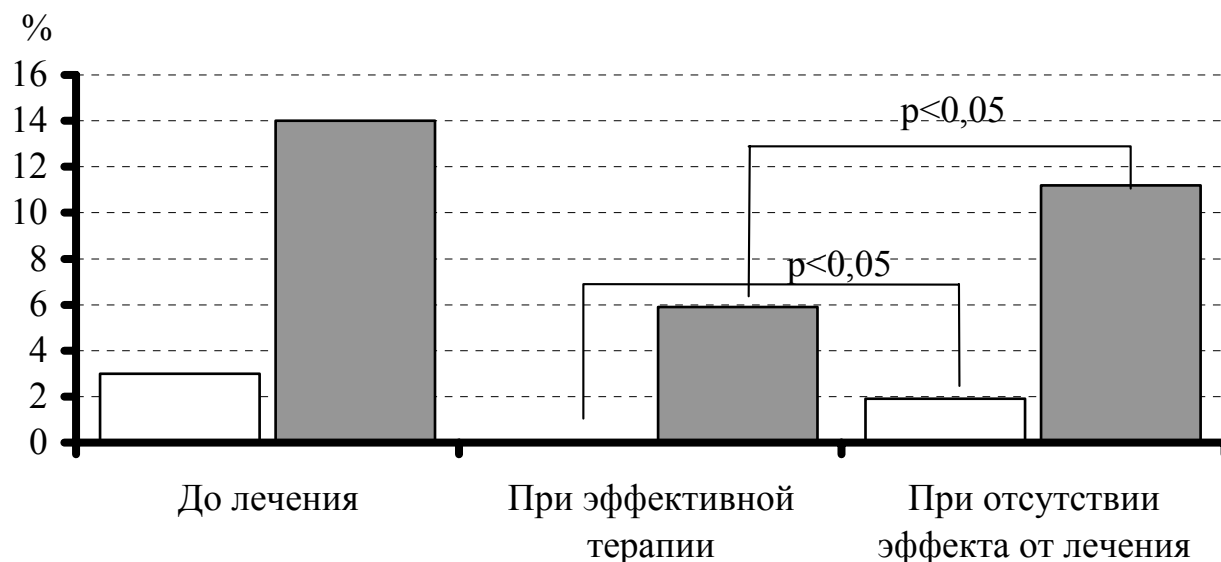


Рис. 1. Активность миелопероксидазы нейтрофилов мокроты в зависимости от эффективности лечения обострения хронической обструктивной болезни легких. Примечание: - количество нейтрофилов с отрицательной реакцией на миелопероксидазу, - количество нейтрофилов со слабовыраженной реакцией на миелопероксидазу.

Таблица 3

Активность протеиназ и ингибиторов в мокроте больных ХОБЛ в зависимости от эффективности терапии через 3 месяца, $\bar{X} \pm m$

Показатель	При эффективной терапии, n=53	При неэффективной терапии, n=14	p
Эластаза, нмоль/мин·мл	$0,32 \pm 0,1$	$0,95 \pm 0,2$	$<0,01$
Трипсиноподобная активность, нмоль/мин·мл	$1,654 \pm 0,18$	$1,63 \pm 0,49$	$>0,05$
α_1 -протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	$0,22 \pm 0,06$	$0,4 \pm 0,05$	$<0,05$
α_2 -макроглобулин, ИЕ/мл	$0,027 \pm 0,004$	$0,024 \pm 0,003$	$>0,05$
Кислотостабильные ингибиторы, МИЕ/мл	$9,92 \pm 0,13$	$4,276 \pm 1,1$	$<0,05$

Анализ полученных результатов показал, что уменьшение количества активных нейтрофилов, снижение активности эластазы, α_1 -ПИ и повышение активности КСИ в мокроте являются критериями эффективности лечения обострения ХОБЛ.

С учетом выделенных критериев эффективности лечения больных с обострением ХОБЛ проведен сравнительный анализ действия фенспирида, являющегося препаратом с противовоспалительным действием и ипратропиума бромидом, обладающего М-холинолитическим действием. Следует отметить, что применение фенспирида не уступало по действию на выраженность кашля и количество мокроты, но и сопровождалось в большей степени ($p < 0,05$) уменьшением выраженности одышки. У пациентов, принимавших фенспирид, средний балл, отражающий выраженность одышки, снижался с $1,74 \pm 0,13$ до $0,97 \pm 0,12$, тогда как у пациентов, лечившихся ипратропиума бромидом – с $1,78 \pm 0,18$ до $1,42 \pm 0,17$. У больных, получавших фенспирид, через 3 месяца лечения отмечалось повышение показателей ОФВ₁ (с $66,58 \pm 5,21\%$ до $71,72 \pm 6,06\%$; $p < 0,001$) и форсированного среднеэспираторного потока МОС₂₅₋₇₅ (с $38,47 \pm 5,46\%$ до $43,71 \pm 6,08\%$; $p = 0,035$), тогда как у больных, принимавших ипратропиума бромид, наблюдалось достоверное повышение только ОФВ₁ ($58,31 \pm 5,13\%$; $63,84 \pm 9,21\%$; $p < 0,02$).

Положительная динамика клинической картины и функциональных показателей при лечении фенспиридом коррелировала с данными цитохимических и биохимических показателей. В мокроте у больных, принимавших фенспирид, в большей степени, чем у больных, лечившихся ипратропиума бромидом, снижалось количество активных нейтрофилов и увеличивалось число неактивных. В крови количество нейтрофилов с разным содержанием МПО в основной группе и группе сравнения не отличалось. Такой результат свидетельствует о влиянии фенспирида на активность нейтрофилов, выражающийся в уменьшении их дегрануляции.

При анализе активности протеиназ и ингибиторов в зависимости от вида назначенной терапии получены данные, свидетельствующие о большей эффективности лечения фенспиридом. При этом через 3 месяца лечения активность эластазы мокроты у больных, принимавших фенспирид, снизилась на 50%, в то время как у пациентов, лечившихся ипратропиума бромидом – на 25%. Также в мокроте у больных, получавших фенспирид, в большей степени, чем у пациентов, лечившихся ипратропиума бромидом, снижалась активность α_1 -ПИ, приближаясь к значениям этого показателя в мокроте группы здоровых, нормализовалась активность КСИ. Следовательно, назначение фенспирида больным с обострением ХОБЛ способствует более выраженной положительной динамике клинической картины, функциональных показателей, а также уменьшению количества активных нейтрофилов, снижению активности эластазы и нормализации активности α_1 -ПИ и КСИ в мокроте.

Таким образом, значение исследования цито- биохимических маркеров воспаления в мокроте при обострении хронической обструктивной болезни легких заключается в возможности оценки выраженности воспалительного процесса в бронхах и контроля над эффективностью лечения.

ВЫВОДЫ

1. Выраженность воспаления в бронхах при обострении хронической обструктивной болезни легких отражают цито-биохимические маркеры в мокроте. Активность миелопероксидазы нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов в крови при обострении заболевания не изменяется.

2. Активность миелопероксидазы нейтрофилов мокроты коррелирует с выраженностью основных симптомов обострения хронической обструктивной болезни легких. Количество активных нейтрофилов в мокроте выше у курящих, чем у некурящих больных, и при инфекционной этиологии обострения заболевания.

3. Обострение хронической обструктивной болезни легких характеризуется высокой активностью эластазы, трипсиноподобных протеиназ, α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина в мокроте на фоне низкой активности кислотостабильных ингибиторов. Активность эластазы мокроты коррелирует с выраженностью симптомов заболевания.

4. Курение при обострении хронической обструктивной болезни легких приводит к повышению активности трипсиноподобных протеиназ и снижению активности α_1 -протеиназного ингибитора в мокроте. Наличие инфекции в бронхах влияет на активность α_2 -макроглобулина в мокроте.

5. Снижение активности миелопероксидазы нейтрофилов, эластазы, а также нормализация активности α_1 -протеиназного и кислотостабильных ингибиторов в мокроте, являются показателями эффективности терапии обострения хронической обструктивной болезни легких.

6. Применение противовоспалительного препарата фенспирида при лечении обострения хронической обструктивной болезни легких способствует более выраженному снижению активности миелопероксидазы, эластазы, нормализации активности α_1 -протеиназного и кислотостабильных ингибиторов в мокроте и улучшению клинической картины.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для оценки эффективности лечения больных с обострением ХОБЛ рекомендуется цитохимическое и биохимическое исследование мокроты. При поступлении в клинику и в процессе лечения необходимо исследовать в мазках мокроты процент нейтрофилов с отрицательной и слабовыраженной реакцией на миелопероксидазу, а также активность эластазы, α_1 -протеиназного ингибитора, кислотостабильных ингибиторов мокроты. При эффективной терапии указанные показатели нормализуются, а при отсутствии эффекта не изменяются.

Учитывая то, что фенспирид способствует нормализации активности МПО нейтрофилов, протеиназ и ингибиторов в мокроте больных ХОБЛ, показано его назначение в составе базисной терапии этого заболевания

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Активность эластазы и ее ингибиторов при разной этиологии обострения у больных ХОБЛ // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. - Приложение 1. – С. 55-57. (соавт.: Е. Б. Букреева, О. Е. Акбашева, Г. А. Суханова и др.)
2. Клинико-генеалогическое исследование больных ХОБЛ // Бюллетень сибирской медицины. - 2002. – № 4. – С. 38-40. (соавт.: Г. Н. Сеитова, С. А. Богушевич, С. В. Нестерович, Е. Б. Букреева)
3. Эффективность эrespала при обострении ХОБЛ // Человек и лекарство: Матер. 9-го Национального конгресса. - 2002. – С. 70. (соавт.: Е. Б. Букреева, Т. Г. Мельник, С. В. Нестерович и др.)
4. Влияние курения на эффективность эrespала при обострении ХОБЛ // Человек и лекарство: Матер. 10-го Национального конгресса. - 2003. – С. 58. (соавт.: Е. Б. Букреева, С. В. Нестерович, Т. Г. Мельник)
5. Роль внутриклеточных возбудителей в этиологии обострений хронического бронхита // Современные пробл. антимикробной терапии: Матер. 4-ой Российской конференции. – М., 2002. – С. 14. (соавт.: Е. Б. Букреева, Т. Г. Мельник, Л. В. Гудкова и др.)
6. Роль ингибиторов протеолиза при заболеваниях бронхо-легочной системы // Съезд физиологов Сибири: Тез. Конференции, 2-4 июля 2002 г. – Новосибирск, 2002. – С. 63. (соавт.: О. Е. Акбашева, Г. А. Суханова, Е. Б. Букреева)
7. Induced sputum cytology at different etiology of exacerbation of chronic obstructive bronchitis // European Respiratory Society Annual Congress. - 2002. – Abstr. 450951. (соавт.: Е. В. Bukreeva, S. V. Nesterovich, T. G. Melnik et al.)
8. Exacerbation aetiology and inflammation markers in chronic obstructive bronchitis // European Respiratory Society Annual Congress. - 2002. – Abstr. 1625 252S. (соавт.: S. V. Nesterovich, G. N. Seitova, E. V. Bukreeva et al.)
9. Противовоспалительная эффективность эrespала и атровента при обострении хронического обструктивного бронхита // Матер. 12-го Национальный конгресс по болезням органов дыхания, г. Москва, 11-15 ноября 2002 г. – М., 2002. – С. 20. (соавт.: Е. Б. Букреева, С. В. Нестерович, Т. Г. Мельник и др.)
10. Влияние эrespала на миелопероксидазу нейтрофилов крови и мокроты у больных хроническим обструктивным бронхитом // Материалы 11-го Национального конгресса по болезням органов дыхания. – М., 2001. – С. 296. (соавт.: Е. Б. Букреева, С. В. Нестерович, Н. М. Шевцова и др.)
11. Полиморфизм генов TNFA и NOS3 у больных ХОБЛ // Матер. 13-го Национального конгресса по болезням органов дыхания. – СПб., 2003. – С. 339 (соавт.: Г. Н. Сеитова, Т. В. Косянкова, Е. Б. Букреева и др.)
12. Экзогенные и эндогенные факторы в формировании хронической обструктивной болезни легких // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. - № 1. – С. 75-77. (соавт.: Е. Б. Букреева, Г. Н. Сеитова, С. В. Нестерович и др.)

13. Биохимическая оценка эффективности лечения хронической обструктивной болезни легких // Матер. 13-го Национального конгресса по болезням органов дыхания. – СПб., 2003. – С.17. (соавт.: Г. Н. Сеитова, Е. Б. Букреева, С. В. Нестерович и др.)

14. Биологические маркеры при инфекционной и неинфекционной этиологии обострения ХОБЛ // Матер. 13-го Национального конгресса по болезням органов дыхания. – СПб., 2003. – С. 323. (соавт.: Г. Н. Сеитова, Е. Б. Букреева, С. В. Нестерович и др.)

15. VNTR polymorphism NOS3 gene among Chronic obstructive pulmonary disease patients // ERS respiratory Society Annual Congress. – Vienna, 2003. – Abstr. 254981. (соавт.: G. N. Seitova, S. V. Nesterovich, E. B. Bukreeva et al.)

16. S and Z alleles of PI gene in chronic obstructive pulmonary disease patients // ERS respiratory Society Annual Congress. – Vienna, 2003. – Abstr. 253751. (соавт.: S. V. Buikin, G. N. Seitova, S. V. Nesterovich et al.)

17. Influence of infection and α_1 -protenase ihibitor on inflammatory response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease exacerbatation // ERS respiratory Society Annual Congress. – Vienna, 2003. – Abstr. 2856 (соавт.: G. N. Seitova, S. V. Nesterovich, E. B. Bukreeva et al.)

18. Bronchial brach-biopsies cytograms in different etiology of COPD exacerbatation // ERS respireatory Society Annual Congress. – Vienna, 2003. – Abstr. 3007. (соавт.: S. V. Nesterovich, G. N. Seitova, E. B. Bukreeva).

19. Proteolytic activity of sputum and serum in patients with COPD exacerbatation in dependence on smoking // ERS respireatory Society Annual Congress. – Vienna, 2003. – Abstr. 3017. (соавт.: G. N. Seitova, S. V. Nesterovich, E. B. Bukreeva et al.).

20. Активность α_1 -протеиназного ингибитора в сыворотке крови у больных легочной и сердечной патологией / Науки о человеке: Сб. статей по материалам четвертого конгресса молодых ученых и специалистов "Науки о человеке" г. Томск, 15-16 мая 2003 г. - Томск, 2003. - С. 6. (соавт.: С. А. Богушевич, О. Ю. Бычкова).

21. Нейтрофильные протеиназы и их ингибиторы в оценке бронхиального воспаления при хронической обструктивной болезни легких // Науки о человеке: Сб. статей по материалам четвертого конгресса молодых ученых и специалистов "Науки о человеке" г. Томск, 15-16 мая 2003 г. – Томск, 2003. - С. 13-14. (соавт.: Г. Н. Сеитова)