

На правах рукописи

ЯМКИНА НАТАЛИЯ СЕРГЕЕВНА

**НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ ТОЛЕРАНТНОСТИ  
«ЗЛОСТНЫХ КУРИЛЬЩИКОВ» К РАЗВИТИЮ ХРОНИЧЕСКОЙ  
ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

14.00.43 – пульмонология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

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, профессор

Зарипова Татьяна Николаевна

кандидат медицинских наук, доцент

Агеева Татьяна Сергеевна

**Ведущая организация:**

ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2009г. в « \_\_\_\_ » часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.02 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2009г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Л.И. Тюкалова

## Введение

### Актуальность проблемы

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – одна из важнейших проблем современного здравоохранения в связи с постоянно возрастающей распространенностью и смертностью от этого заболевания [Чучалин А.Г., 2000, 2003; Barnes P.J., 2003, 2004; GOLD, 2003, 2006]. В настоящее время во всем мире отмечается тенденция к увеличению заболеваемости ХОБЛ: только за период с 1990 года по 1997 год этот показатель увеличился на 25% у мужчин и на 69% у женщин [Овчаренко С.И., 2003, 2004; Федеральная программа по ХОБЛ, 2004]. В то же время, в период с 1966 до 1995 г. летальность от ишемической болезни сердца и инсульта снизились на 45% и 58% [Авдеев С.Н., 2003]. Согласно прогнозам ВОЗ, ХОБЛ станет третьей в структуре общей смертности и пятой в структуре заболеваемости в мире к 2020 году [Чучалин А.Г., 2000; Lopez A.D., 1998; Barnes P.J., 2004]. В России уже сегодня по официальным данным МЗ РФ, ХОБЛ занимает 4-5 место среди всех причин смертности (после сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, травм) [Ноников В.Е., 2001, 2002; Федеральная программа по ХОБЛ, 2004]. Наиболее важными причинами этого является ежегодное увеличение числа курящих людей, практически неограниченная реклама табачных изделий и отсутствие реальных профилактических мероприятий на государственном уровне [Ноников В.Е., 2001, 2002; Овчаренко С.И., 2003]. В 2000г. от ХОБЛ в мире умерло 2 млн. 740 тыс. человек. Эпидемиологические данные о заболеваемости и смертности часто не дают полного представления о значении и распространенности ХОБЛ, поскольку обычно болезнь не диагностируется до развития клинически выраженных и относительно тяжелых стадий заболевания. К большому сожалению, больные ХОБЛ обращаются за медицинской помощью уже на поздних стадиях заболевания, когда возможности терапии крайне ограничены. Так, Европейское Респираторное Общество информирует, что только 25% случаев заболевания диагностируется своевременно. По официальным данным в России около 1 миллиона больных ХОБЛ, в то время как по данным эпидемиологических исследований число таких больных в нашей стране может превышать 11 миллионов человек. В США заболеваемость ХОБЛ приближается к 15 млн. человек [Чучалин А.Г., 2000; Овчаренко С.И., 2003, 2004; Федеральная программа по ХОБЛ, 2001, 2004]. ХОБЛ – заболевание с полигенным характером наследования, относится к группе экологически зависимых болезней органов дыхания [Ивчик Т.В., 2003]. Диагноз ХОБЛ следует предполагать у всех кашляющих пациентов при наличии факторов риска, способствующих развитию ХОБЛ. К этим факторам относятся: курение, как активное, так и пассивное; длительное воздействие профессиональных раздражителей (пыль, химические поллютанты, пары кислот и щелочей); атмосферное и домашнее загрязнение воздуха; наследственное предрасположение. Определенную роль играют частые респираторные инфекции, особенно в детском возрасте, проживание пациента в холодной климатической зоне, малый вес при рождении. Ведущим этиологическим фактором развития ХОБЛ является курение.

Известно, что заболевание развивается примерно у 15-20% курильщиков. Подтверждена роль только одного эндогенного фактора – дефицита альфа-1-антитрипсина, что отмечается не более чем у 1% всех больных ХОБЛ. Возникает вопрос – почему не все курящие заболевают? На сегодняшний день полностью не изучены механизмы, которые предупреждают развитие ХОБЛ у длительно курящих субъектов – «злостных курильщиков».

Известно, что курение является важнейшим фактором риска развития ХОБЛ, способствует более тяжелому течению заболевания. Многие 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, иммунодефицитного состояния. [Голуб Н.И., 1992; Чучалин А.Г., 2000; Hunninghake G.W., 1983]. Выявление факторов, поддерживающих толерантность к развитию ХОБЛ, позволит дать теоретическую основу для разработки не только средств профилактики, но и лечения этого заболевания.

Единственная доказанная стратегия, замедляющая прогрессирование болезни, – отказ от курения [Willemse B.W., 2003, 2005; GOLD 2003, 2006]. Вместе с тем, недостаточно информации о влиянии прекращения курения на клиническую картину болезни, на факторы воспаления при обострении ХОБЛ и динамику этих показателей на фоне лечения.

**Цель исследования:** выявление факторов толерантности «злостных курильщиков» к развитию ХОБЛ; изучение влияния курения на клиническое течение, биомаркеры воспаления и морфофункциональные свойства нейтрофилов при обострении ХОБЛ.

#### **Задачи исследования**

1. Дать сравнительную оценку значений биомаркеров воспаления и показателей морфофункциональных свойств нейтрофилов в различных регионах – бронхиальном, крови, очаге асептического воспаления у «злостных курильщиков» в сопоставлении со здоровыми некурящими.

2. Исследовать биомаркеры воспаления и показатели морфофункциональных свойств нейтрофилов при обострении ХОБЛ и переходе в стабильное течение на различных стадиях прогрессирования болезни.

3. Сопоставить значения биомаркеров воспаления и показателей морфофункциональных свойств нейтрофилов у группы «злостных курильщиков» с аналогичными показателями при ХОБЛ.

4. Исследовать в сравнительном аспекте клиническое течение обострений ХОБЛ у некурящих, бывших курильщиков и продолжающих курить.

5. Сравнить цито-биохимические характеристики воспаления при обострении ХОБЛ у некурящих, бывших курильщиков и продолжающих курить.

#### **Научная новизна работы**

Впервые показано, что у «злостных курильщиков» без клинических и спирометрических признаков ХОБЛ в бронхиальном регионе формируется

нейтрофильное воспаление с высокой активностью в индуцированной мокроте протеолитических ферментов – эластазы, трипсиноподобных протеаз и их ингибиторов –  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора,  $\alpha_2$ -макроглобулина, кислотостабильных ингибиторов, с повышенной концентрацией малонового диальдегида.

Впервые выявлено, что длительное курение модифицирует морфофункциональные свойства нейтрофилов бронхиального региона, заключающиеся в большей концентрации в цитоплазме миелопероксидазы и катионных протеинов.

Впервые показано, что при длительном курении изменяются хемотаксические характеристики нейтрофильного и макрофагального пулов: в отпечатке «кожного окна» по сравнению с никогда некурящими через 4 часа после скарификации визуализируется большее количество нейтрофилов, а через 20 часов не происходит трансформации нейтрофильной фазы воспаления в макрофагальную.

Впервые обнаружено, что у «злостных курильщиков» изменение морфофункциональных свойств нейтрофилов носит системный характер – нейтрофилы в очаге воспаления, как в бронхиальном регионе, так и при асептическом воспалении – в «кожном окне», содержат большее количество миелопероксидазы, по сравнению с группой здоровых некурящих.

Впервые показано, что у «злостных курильщиков» толерантность к развитию ХОБЛ может поддерживаться особенностями воспаления в бронхиальном регионе, отличающимися от ХОБЛ: более высокой активностью протеолитических ингибиторов –  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина, меньшей активностью протеиназ – эластазы и трипсиноподобных протеиназ, более низкими значениями активности калликреин-кининовой системы (калликреиногена, калликреина), меньшим содержанием малонового диальдегида и более высокой активностью каталазы, большим количеством миелопероксидазы и катионного протеина в цитоплазме нейтрофилов индуцированной мокроты.

Впервые установлено, что при обострении ХОБЛ III-IV стадии у курящих, бывших курящих, никогда некурящих фактор курения не оказывает влияния на такие показатели как клинический индекс,  $ОФВ_1$ , дистанцию, проходимую пациентом в тесте с 6-минутной ходьбой, и их динамику после купирования обострения.

Впервые показано, что отказ от курения в течение 5-6 лет пациентов с ХОБЛ III-IV стадии, бывших злостных курильщиков, не влияет на количественные показатели биомаркеров воспаления в бронхиальном регионе и морфофункциональные свойства нейтрофилов, значения которых остаются на уровне больных ХОБЛ III-IV стадии, злостных курильщиков, продолжающих курение.

Впервые установлено, что при ХОБЛ III-IV стадии у никогда некурящих пациентов количественные значения биомаркеров воспаления и морфофункциональные свойства нейтрофилов отличаются от данных у курящих и бывших курящих больных ХОБЛ более высокой активностью калликреина, более высо-

кой активностью эластазы при обострении и более значительным ростом активности  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина в индуцированной мокроте после купирования обострения, более низкой концентрацией миелопероксидазы в нейтрофилах крови при обострении ХОБЛ и увеличением значения этого показателя после купирования обострения.

### **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.

### **Апробация работы**

Материалы исследования доложены и обсуждены на I съезде терапевтов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2005), 15 Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Москва, 2005), Европейском респираторном конгрессе (Мюнхен, 2006), VII и VIII конгрессах молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2006, 2007), 7-й Международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке (Москва, 2006), практической конференции для врачей ОГУЗ «Областная клиническая больница» (2006), Европейском респираторном конгрессе (Стокгольм, 2007) на проблемной комиссии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава по пульмонологии, на заседаниях кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликована 21 печатная работа, из них 2 статьи в журналах из «Перечня ...» ВАК РФ. Получены два патента на изобретение (№2298183, №2298184 от 27 апреля 2007г.; Бюллетень изобретений №12, 2007г.).

### **Практическая значимость работы**

Полученные данные формируют представление о некоторых протективных механизмах, препятствующих развитию ХОБЛ у «злостных курильщиков», что создает теоретический базис для разработки средств прицельной профилактики и терапии ХОБЛ. Кроме того, эти данные закладывают основу поиска способов для идентификации степени риска развития заболевания.

На основании проведенного исследования сделано заключение, что наиболее информативным средством контроля эффективности лечения обострений ХОБЛ II-IV стадии является динамика респираторных симптомов – кашля, продукции мокроты, одышки, хрипов, ночного удушья и их суммарного показателя – клинического индекса, контроль дистанции, проходимой пациентом в тесте с 6-минутной ходьбой, и недостаточную информативность для мониторинга обострения показателя  $ОФВ_1$ .

Данные настоящего исследования показывают, что отказ от курения пациентов с ХОБЛ в качестве средства, уменьшающего прогрессирование болезни, должен происходить на ранних стадиях болезни.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. У «злостных курильщиков» без клинических и спирометрических признаков ХОБЛ в бронхиальном регионе инициируется нейтрофильное воспаление с высокой активностью протеолитических ферментов и их ингибиторов, повышенной концентрацией малонового диальдегида в индуцированной мокроте, происходит модифицирование морфофункциональных свойств лейкоцитов нейтрофильного и макрофагального пулов.

2. У «злостных курильщиков» толерантность к развитию ХОБЛ может поддерживаться высокой активностью протеолитических ингибиторов и меньшей активностью протеиназ, низкой активностью калликреин-кининовой системы, высокой активностью каталазы в бронхиальном регионе, большим количеством миелопероксидазы и катионных протеинов в цитоплазме нейтрофилов бронхиального региона.

3. Положительная динамика лечения обострений ХОБЛ III-IV стадии проявляется независимо от фактора курения (курящие, бывшие курящие, никогда некурящие) регрессом респираторных симптомов – кашля, продукции мокроты, одышки, хрипов, ночного удушья и уменьшением их суммарного показателя – клинического индекса при отсутствии динамики значений  $ОФВ_1$  и дистанции, проходимой в тесте с 6-минутной ходьбой.

4. У бывших злостных курильщиков при ХОБЛ III-IV стадии отказ от курения в течение 5-6 лет при обострении болезни не оказывает влияния на респираторные симптомы, динамику  $ОФВ_1$ , дистанцию в тесте с 6-минутной ходьбой, на количественные показатели биомаркеров воспаления в бронхиальном регионе и морфофункциональные свойства нейтрофилов, значения которых остаются на уровне больных ХОБЛ III-IV стадии, злостных курильщиков, продолжающих курение.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста, содержит 35 таблиц, 5 рисунков и состоит из введения, обзора литературы (первая глава), материалов и методов исследования (вторая глава), результатов исследования (третья глава), обсуждения результатов (четвертая глава), выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

Библиографический указатель содержит 208 источников литературы, из которых 77 на русском языке, 131 на английском языке.

### **Клинические группы и методы исследования**

Мы исследовали группу «злостных курильщиков» – 30 курящих мужчин в возрасте от 44 до 62 лет (средний возраст –  $54,3 \pm 1,02$  лет) без спирометрических и клинических признаков ХОБЛ. В этой группе интенсивность курения от 25 до 60 пачка/лет (средний анамнез курения –  $34,9 \pm 1,4$  пачка/лет), что позволяет отнести обследованную группу к категории «злостных курильщиков». Длительное курение у части пациентов, инициировало развитие необструктивного (простого) хронического бронхита, проявляющегося непостоянным утренним кашлем с выделением слизистой мокроты в небольшом количестве (19 пациентов).

В программу обследования было включено 116 пациентов с ХОБЛ, из них 4 женщины и 112 мужчин в возрасте от 38 до 70 лет, средний возраст  $58,2 \pm 1,03$  года. Диагноз основывался на данных анамнеза, клинической картины заболевания (кашель, продукция мокроты, одышка, сухие хрипы, клинические признаки эмфиземы), показателях вентиляции легких (ОФВ<sub>1</sub>, ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ) согласно рекомендациям GOLD (2003, 2006, 2007). Длительность заболевания от 4 до 32 лет, в среднем –  $22,5 \pm 8,2$  лет.

По стадиям ХОБЛ согласно GOLD 2003, 2006 больные распределились следующим образом: I стадия диагностирована у 7 больных ( $51 \pm 2,61$  лет), II стадия – у 20 ( $55 \pm 2,61$  лет), III стадия – у 41 ( $56,53 \pm 1,5$  лет) и IV стадия – у 48 больных ( $61,57 \pm 1,53$  лет). Средние значения спирометрических критериев ХОБЛ обследованного контингента: при I стадии ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ –  $65,6 \pm 3,9$  %, ОФВ<sub>1</sub> –  $81,7 \pm 2,4$  % (от должных значений), при II стадии ОФВ<sub>1</sub> –  $66,2 \pm 2,0$  %, III стадии ОФВ<sub>1</sub> –  $39,3 \pm 4,2$  %, при IV стадии –  $18,2 \pm 3,2$  %.

В зависимости от ирритативного фактора больные ХОБЛ были разделены на три группы: курящие, бывшие курящие, никогда некурящие. Количество курящих больных – 65 ( $55,18 \pm 2,02$  лет), бывших курящих – 23 ( $59,5 \pm 2,04$  лет), никогда некурящих – 15 ( $59,4 \pm 1,58$  лет). Профессиональные вредности в анамнезе (химические раздражители, газы, пыль, воздействие высоких и низких температур) имели место у 82 (70,7%) больных.

Для анализа влияния ирритативного фактора и сопоставимости сравниваемых групп были исключены пациенты с I стадией заболевания и женщины (4 пациентки со II стадией болезни). Таким образом, для исследования фактора курения больные распределились следующим образом: II стадия – 14 человек, III стадия – 41, IV-я стадия – 48 (всего – 103 пациента). В зависимости от ирритативного фактора 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%). Интенсивность курения оценивалась по значениям анамнеза курящего человека (пачка/лет: число выкуриваемых сигарет в сутки  $\times$  стаж курения (годы)/ 20) и составила от 20 до 100 пачек/лет. Средний анамнез курения –  $38,8 \pm 2,1$  пачек/лет, что позволяет отнести обследованных больных к категории злостных курильщиков. В группе бывших курящих длительность отказа от курения составляла от 6 месяцев до 10 лет ( $6,07 \pm 1,8$  лет). Индекс курения бывших курящих –  $34,3 \pm 2,1$  пачка/лет (злостные курильщики). В группе никогда некурящих больных ХОБЛ у 12 пациентов выявлены профессиональные вредности, у 4 пациентов в детстве было воздействие пассивного курения, у 5 пациентов близкие родственники страдали ХОБЛ, 2 больных родились недоношенными. В группе курящих больных ХОБЛ 33 пациента в детстве подвергались пассивному курению, у 17 пациентов близкие родственники больны ХОБЛ, 3 больных родились недоношенными, у 57 пациентов были профессиональные вредности.

Все больные ХОБЛ находились на лечении в пульмонологическом отделении Областной клинической больницы в период с сентября 2004 по октябрь

2006 года. Пациенты обследованы дважды: при поступлении в клинику и на 14-16 день терапии. Терапия обострения проводилась в соответствии с рекомендациями GOLD 2003, 2006 и Федеральной программы по ХОБЛ 2004 г., включала назначение ингаляционных бронхолитиков, системных кортикостероидов в дозе 30-40 мг/сут преднизолона или других ГКС в эквивалентной дозе в течение 10-14 дней, отхаркивающих средств, при необходимости назначалась антибактериальная терапия.

Основанием для включения в исследование было:

- установленный диагноз ХОБЛ 1-4 стадии, период обострения.
- возраст от 40-70 лет.

В исследование не включались:

- больные, с атопическими болезнями и другими тяжелыми заболеваниями;
- больные, имеющие сопутствующие заболевания воспалительного характера;
- заболевания с сердечной недостаточностью (III—IV ФК по NYHA);
- пациенты, длительно принимающие системные и ингаляционные ГКС.

Клинические симптомы оценивались в баллах (0-4 балла) по шкале, предложенной Ю.Л. Кунициной и Е.И.Шмелевым (2003г), определялось значение клинического индекса (КИ) до и после проведенной терапии.

В качестве контрольной группы было обследовано 30 здоровых некурящих добровольцев в возрасте от 30 до 65 лет ( $49,9 \pm 1,3$  лет). Условиями для включения в контрольную группу были: отсутствие кашлевого анамнеза, бронхиальной астмы, бронхита, нормальные показатели функции внешнего дыхания по данным спирографии, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних трех месяцев.

Материалом для ряда исследований была индуцированная мокрота. До процедуры больной выполнял ингаляцию сальбутамола (200 мкг, 2 вдоха). Мокроту получали после последовательно проводимых ингаляций 3-,4-,5- % раствора хлорида натрия посредством небулайзера, с продолжительностью каждой из них 4-5 минут. Мокрота исследовалась не позднее 2 часов после получения. Часть мокроты гомогенизировали в 1 мл 0,9% физиологического раствора с трипсином и ставили в термостат при  $t 37^{\circ}\text{C}$  на 30 мин, затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин, выделяли осадочную взвесь. Из осадка готовили мазки в количестве 4 от одного больного, которые затем использовались для оценки цитологического состава индуцированной мокроты. Проводился дифференцированный подсчет 400 клеток, среди которых учитывались нейтрофилы, макрофаги, эозинофилы, лимфоциты, выраженные в процентах. Часть мазков использовалась для цитохимической оценки активности нейтрофилов. Другую часть мокроты подвергали однократному «замораживанию-оттаиванию» с последующим измерением активности протеиназ/антипротеазной, оксидант/антиоксидантной, калликреин-кининовой систем.

Проводился забор капиллярной крови, из которой готовили мазки в количестве 4 от одного больного, которые затем использовались для цитохимической оценки активности МПО и содержания КП в нейтрофилах.

Для определения содержания миелопероксидазы в нейтрофилах применялся метод Грэхема – Кнолля. В качестве красителя для мазков индуцированной мокроты, периферической крови использовался азур-І. При цитохимическом исследовании катионных белков применялся модифицированный метод [Пигаревский Е.В., Мезинг В.Н., 1981]. Метод компьютерной морфометрии осуществлялся фотографированием нейтрофилов в мазках индуцированной мокроты и периферической крови цифровой фотокамерой Sony DSC-S70 в световом микроскопе при увеличении  $\times 1000$ , с максимальным разрешением. Скенограмму импортировали в программу Adobe Photoshop, с помощью которой определяли площадь нейтрофила в  $\mu\text{м}^2$ , площадь цитоплазмы нейтрофила, площадь занимаемую гранулами, измеряли оптическую плотность гранул (патент на изобретение №2298183, №2298184 от 27 апреля 2007г.; Бюллетень изобретений №12, 2007г). В индуцированной мокроте биохимическими методами исследовалась активность компонентов протеиназ/антипротеиназной системы: эластазы, трипсиноподобных протеиназ,  $\alpha_1$ —протеиназного ингибитора,  $\alpha_2$  —макроглобулина, кислотостабильных ингибиторов; показателей каллекреин-кининовой системы, оксидант/антиоксидантной системы: малонового диальдегида, каталазы, супероксиддисмутазы [Оглоблина О.Г., Платонова Л.В., Пасхина Т.С., 1984; Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С., 1979; Камышников В.С., 2005; Королюк М.А., 1988; Брусов О.С., 1976].

Исследование активности нейтрофилов в регионе асептического воспаления проводилось по методике «кожного окна» [Rebuck, J.W., 1955; Маянский Д.Н., 1997]. Отпечатки окрашивались цитохимическим методом по Грэхему – Кноллю и исследовались с помощью иммерсионной микроскопии. В отпечатках КО определялось соотношение лейкоцитов (%), активность МПО в нейтрофилах, которую оценивали полуколичественно методом G. Astaldi (1957).

Исследование функции внешнего дыхания выполнялось на спироанализаторе – «Диамант». Оценка спирометрических показателей проводилась по отношению к должным величинам в зависимости от возраста, пола и роста. Степень обратимости бронхиальной обструкции оценивалась после проведения: пробы с ингаляцией  $\beta_2$ -агониста короткого действия (сальбутамол 400 мкг) и пробы с антихолинергическим препаратом (ипратропий бромид 80мкг). Во внимание принимались постбронходилатационные значения ОФВ<sub>1</sub>. Всем пациентам выполнялся тест с 6-минутной ходьбой в соответствии со стандартным протоколом [Enright P.L., Sherill D.L., 1998], дополненный измерением сатурации крови кислородом с помощью пульсоксиметра. С учетом пола, массы, роста и возраста вычислялись должные показатели проходимой дистанции.

В статистической обработке материала использовали непараметрические методы. Проверку на нормальность распределения данных проводили с помощью критерия Шапиро-Вилка. При сравнении независимых выборок в случаях отклонения распределения от нормального применяли критерий Манна-Уитни. Результаты представлены в виде среднего с указанием стандартной ошибки ( $\bar{X} \pm m$ ). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался  $< 0,05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

На сегодняшний день в достаточной степени не изучены факторы и механизмы, которые предупреждают развитие ХОБЛ у длительно курящих субъектов – «злостных курильщиков». Поиск ответа на этот вопрос был целевой установкой нашей работы. В общем виде дизайн исследования для решения этого вопроса заключался в сравнении значений показателей биомаркеров воспаления у лиц, длительный «стаж» курения которых мог бы привести к развитию клинически выраженной ХОБЛ. Исследовались биомаркеры воспаления, роль которых в генезе ХОБЛ имеет высокий уровень доказательности. К ним относятся протеиназ/антипротеиназная, оксидант/антиоксидантная системы. Поскольку нейтрофил рассматривается в качестве одной из эффекторных клеток генеза ХОБЛ, изучались некоторые морфофункциональные свойства нейтрофилов различных регионов – бронхиального (индуцированная мокрота), крови, очага асептического воспаления (отпечаток «кожного окна»). Исследовалась мало изученная при ХОБЛ – калликреин-кининовая система. Сравнение проводили с больными ХОБЛ в начальный период обострения и после купирования симптомов обострения (через 14-16 дней после лечения). Выбор периода обострений обусловлен тем, что прогрессирование болезни, интенсивность прироста симптомов в значительной степени связаны с частотой обострений и, что при обострении, являющимся кульминационной фазой болезни, наиболее значимо проявляются патогенетические механизмы, инициирующие развитие ХОБЛ. Интерпретация исследуемых показателей у «злостных курильщиков» и при ХОБЛ поддерживалась сравнениями с их значениями в группе здоровых, никогда некурящих добровольцев.

Исследования последних лет показали, что существенную роль в молекулярных механизмах патогенеза хронической обструктивной болезни легких играет свободнорадикальное окисление [Чучалин А. Г., 2004]. Состояние ПОЛ оценивали по содержанию малонового диальдегида в индуцированной мокроте. У «злостных курильщиков» было обнаружено статистически значимое повышение содержания МДА в мокроте по сравнению с контрольной группой, что согласуется с результатами других исследователей [Altuntas E., 2003; Hanta I., 2006; Isik B., 2007]. Вместе с тем, содержание МДА в индуцированной мокроте у «злостных курильщиков» статистически значимо было ниже, чем у пациентов с ХОБЛ. При ХОБЛ, по отношению к здоровым некурящим и «злостным курильщикам», отмечено значительное повышение содержания МДА в мокроте. Эти результаты согласуются с имеющимися данными в литературе [Новоженков В. Г., 1996; Calikoglu M. 2002; Altuntas E., 2003; Tug T., 2004; Isik B., 2005; Hanta I., 2006]. Нами получены результаты, указывающие, что количество МДА в мокроте увеличивалось по мере прогрессирования заболевания, достигая максимальных значений на поздних стадиях. Установлено, что у «злостных курильщиков» активность антиоксидантного компонента – каталазы, выше, чем у пациентов с ХОБЛ. Согласно имеющимся представлениям, активация ПОЛ при ХОБЛ сопровождается снижением антиоксидантной защиты [Barnes P.J., 2003; Соодаева С.Г., 2004]. Нами этот факт подтвержден: при

обострении ХОБЛ активность каталазы на всех стадиях болезни была меньше по сравнению с контрольной группой с наименьшим значением при IV стадии болезни (табл.1). Активность СОД снижалась лишь на поздних стадиях развития ХОБЛ по сравнению, как с группой здоровых некурящих, так и с группой «злостных курильщиков».

Таблица 1

Содержание малонового диальдегида (МДА), каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в индуцированной мокроте у здоровых некурящих, «злостных курильщиков» (более 25 пачка/лет) и при обострении ХОБЛ ( $X \pm m$ )

Показатели	Здоровые некурящие n=24	Злостные курильщики n=27	Больные ХОБЛ (стадии)				P
			I n=6	II n=18	III n=34	IV n=40	
			1	2	3	4	
МДА (ммоль/мл)	0,61± 0,25	2,95± 0,38	3,63± 0,5	3,86± 0,90	4,98± 0,55	5,66± 0,58	P <sub>1-2,3,5,6</sub> <0,02 P <sub>1-4</sub> <0,03 P <sub>2-3,4</sub> <0,02 P <sub>2-5,6</sub> <0,001 P <sub>3,4-6</sub> <0,05
Каталаза (мккатал/л)	126,5± 15,5	90,77± 14,6	56,74± 6,5	48,4± 11,1	39,56± 5,7	40,71± 5,3	P <sub>2-5,6</sub> <0,05 P <sub>1-3,4</sub> <0,04 P <sub>1-5,6</sub> <0,03
СОД (Ед/мл)	11,0± 0,51	10,64± 0,64	9,81± 0,67	9,98± 0,77	9,78± 0,87	7,6± 0,5	P <sub>2-6</sub> <0,05 P <sub>1-6</sub> <0,05

После курса терапии обострения ХОБЛ повышение активности каталазы происходило только при III стадии. В стабильную фазу болезни показатель активности этого фермента не увеличивался до контрольного уровня. Это еще раз подчеркивает роль обострений и указывает на один из механизмов прогрессирования ХОБЛ – снижение активности каталазы в бронхиальном регионе особенно в период обострения. Активность СОД индуцированной мокроты после терапии обострения существенно не изменялась ни на одной стадии ХОБЛ по сравнению с аналогичными показателями до лечения.

Биоцидный потенциал нейтрофилов обеспечивается бактерицидными системами – кислородзависимой и не кислородзависимой. К кислородзависимой системе бактерицидности относится миелопероксидаза. Результаты исследования показали, что у «злостных курильщиков» содержание МПО в нейтрофилах индуцированной мокроты больше, чем в группах здоровых некурящих и больных ХОБЛ (табл.2).

Таблица 2

Содержание миелопероксидазы (ед. опт. плотн.) в нейтрофилах индуцированной мокроты у здоровых некурящих, «злостных курильщиков» (>25 пачка/лет) и при обострении ХОБЛ ( $X \pm m$ )

Здоровые некурящие n=28	Злостные курильщики n=27	Больные ХОБЛ (стадии)			p
		II n=18	III n=32	IV n=37	
		1	2	3	
1	2	3	4	5	

28,27±2,82	58,76±4,93	32,35±4,07	30,93±2,77	41,04±5,42	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{2-3,4,5} < 0,001$
------------	------------	------------	------------	------------	--

Эта направленность различий наблюдалась как при обострении ХОБЛ, так и в фазу стабильного течения. В нейтрофилах «кожного окна» у «злостных курильщиков» по сравнению с группой здоровых некурящих также содержалось большее количество МПО –  $1,49 \pm 0,25$  и  $0,37 \pm 0,2$  ( $p < 0,05$ ), соответственно. Таким образом, нейтрофилы индуцированной мокроты и «кожного окна» у «злостных курильщиков» отличаются высокой концентрацией миелопероксидазы. Вместе с тем, нейтрофилы крови содержали одинаковое количество миелопероксидаз у здоровых некурящих, «злостных курильщиков» и у больных ХОБЛ. Следовательно, у «злостных курильщиков» нейтрофилы регионов, где действуют факторы воспаления – «кожное окно» как асептическое воспаление, слизистая оболочка бронхов – персистирующее воспаление, поддерживаемое факторами табачного дыма, проявляют свойство – активизировать биоцидный потенциал через активацию миелопероксидазного компонента. Вероятно, при ХОБЛ происходит аналогичный процесс миелопероксидазной активации. Однако нейтрофилы бронхиального региона при ХОБЛ содержат меньшее количество МПО. Рядом авторов высказываются суждения, что снижение содержания МПО в нейтрофилах при ХОБЛ II – IV стадии обусловлено утратой ПМЯЛ около половины активности их МПО во время поглощения микроорганизмов [Barnes P.J., 2003]. Есть мнение, что метаболиты кислорода и протеазы, освобождаемые из активированных ПМЯЛ, могут инактивировать пероксидазы, включая МПО [Nowak D., 1997].

Таким образом, сравнительный анализ состояния оксидант/антиоксидантной системы показал, что у «злостных курильщиков» имеются отличия в значениях показателей этой системы от пациентов с ХОБЛ. Эти отличия заключаются в меньшей концентрации продукта перикисного окисления липидов – малонового диальдегида и большей активности антиоксиданта каталазы в ИМ, в высокой концентрации МПО в нейтрофилах индуцированной мокроты и очага асептического воспаления – «кожного окна». Следовательно, толерантность «злостных курильщиков» к развитию ХОБЛ может обеспечиваться способностью нейтрофилов сохранять внутриклеточно миелопероксидазу, высокой активностью антиоксидантного компонента – каталазы. Эту концепцию толерантности курильщиков к ХОБЛ высказывают I. Hanta с соавт. (2006), которые сообщают о повышении антиоксидантной защиты у некоторых здоровых курящих в ответ на агрессию оксидантов. Этим они объясняют, почему не все курильщики заболевают. Эту концепцию поддерживает J.E. Repine (1997), который предполагает, что лица с высоким антиоксидантным ответом могут быть менее восприимчивы к ХОБЛ, а люди с низкой антиоксидантной защитой чувствительны к развитию этого заболевания.

Из показателей кислороднезависимой системы биоцидных факторов ПМЯЛ нами исследовалось содержание катионных протеинов в нейтрофилах индуцированной мокроты и крови. Оказалось, что в нейтрофилах мокроты у «злостных курильщиков» содержится больше гранул КП по сравнению со здо-

ровыми некурящими и больными ХОБЛ всех стадий (табл. 3). В нейтрофилах крови содержание КП у «злостных курильщиков» не отличалось от показателей контрольной группы.

Таблица 3

Содержание катионного протеина (ед.опт. плотн.) в нейтрофилах индуцированной мокроты у здоровых некурящих, «злостных курильщиков» (более 25 пачка/лет) и при обострении ХОБЛ ( $X \pm m$ )

Здоровые некурящие n=26	Злостные курильщики n=27	Больные ХОБЛ с различными стадиями заболевания			
		I n=7	II n=16	III n=32	IV n=39
1	2	3	4	5	6
54,6±0,1	57,9±2,4	48,1±2,2	47,9±3,6	47,9±3,7	47,5±3,2
$P_{1-2} < 0,02$ ; $P_{2-3} < 0,02$ ; $P_{2-4} < 0,03$ ; $P_{2-5} < 0,001$ ; $P_{2-6} < 0,001$					

Таким образом, фактор курения у «злостных курильщиков» без клинических и спирометрических признаков ХОБЛ инициирует увеличение продукции катионных протеинов в нейтрофилах мокроты. При развитии ХОБЛ количество гранул КП в цитоплазме нейтрофилов мокроты снижается. Высокую концентрацию гранул катионных протеинов в нейтрофилах индуцированной мокроты у «злостных курильщиков» можно рассмотреть с позиций толерантности «злостных курильщиков» к развитию ХОБЛ. Катионные белки участвуют в лизосомальных процессах уничтожения микроорганизмов. Возможно, способность нейтрофилов продуцировать большое количество катионных протеинов у длительно курящих субъектов – «злостных курильщиков», позволяет в полной мере реализовать нейтрофильный биоцидный потенциал, тем самым ограничивать персистенцию инфекционного компонента на фоне воспаления, инициируемого факторами табачного дыма.

Особый интерес в исследовании ХОБЛ, представляет оценка системы «протеиназы/ингибиторы». У «злостных курильщиков» активность эластазы выше в 1,2 раза, чем у здоровых некурящих, трипсиноподобных протеиназ – в 4,5 раза. Активность  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина была выше у «злостных курильщиков» по сравнению с контрольной группой в 2,3 и 4,6 раза соответственно (табл. 4,5). При ХОБЛ активность эластазы и трипсиноподобных протеиназ увеличивается, по сравнению со «злостными курильщиками» уже на ранних стадиях болезни. При этом к III-IV стадии болезни кратность увеличения составляет 5 – 10. У больных со II стадией ХОБЛ после лечения активность протеиназ снижается и достигает значений группы «злостных курильщиков», а у больных с III и IV стадиями продолжает превышать как показатели здоровых некурящих, так и «злостных курильщиков».

Увеличение активности протеиназ в индуцированной мокроте при ХОБЛ сопровождается модификацией ингибиторной активности мокроты. Активность  $\alpha_1$ -ПИ и  $\alpha_2$ -МГ снижалась по мере прогрессирования болезни и при IV стадии составляла всего 6% и 36% от нормы. Активность антипротеиназ в группе «злостных курильщиков» превышала показатели при ХОБЛ в 3 – 30 раз. В ста-

бильный период сохранялись такие же соотношения ингибиторов между показателями у «злостных курильщиков» и при ХОБЛ.

Таблица 4

Активность эластазы (нмольБАНЭ/мин мл) и трипсиноподобных протеиназ (ТПП) (нмольБАНЭ/мин мл) в индуцированной мокроте здоровых некурящих, «злостных курильщиков» (более 25 пачка/лет) и при обострении ХОБЛ ( $X \pm m$ )

Показатели	Здоровые некурящие n=28	Злостные курильщики n=29	Больные ХОБЛ (стадии)				p
			I n=7	II n=20	III n=36	IV n=42	
			1	2	3	4	
Эластаза	0,56± 0,01	0,62± 0,01	0,76± 0,3	1,62± 0,7	3,18± 0,3	5,68± 0,2	P <sub>1-2,3,4,5,6</sub> <0,0001 P <sub>2-3,4,5,6</sub> <0,0001
ТПП	0,41± 0,04	1,84± 0,30	2,85± 0,8	3,61± 0,44	5,24± 0,37	7,77± 0,5	P <sub>1-2,4,5,6</sub> <0,0001 P <sub>1-3</sub> <0,02 P <sub>2-4</sub> <0,002 P <sub>2-5,6</sub> <0,0001

Таблица 5

Активность ингибиторов протеиназ в индуцированной мокроте у здоровых некурящих, «злостных курильщиков» (более 25 пачка/лет) и при обострении ХОБЛ ( $X \pm m$ )

Показатели (МИЕ/мл)	Здоровые некурящие n=28	Злостные курильщики n=29	Больные ХОБЛ (стадии)				p
			I n=7	II n=20	III n=36	IV n=42	
			1	2	3	4	
α <sub>1</sub> - протеиназный ингибитор	148,45 ± 9,61	341,17 ± 41,77	81,80± 2,72	59,97± 7,42	28,45± 3,02	10,67± 1,45	P <sub>1-2, 3, 4, 5, 6</sub> <0,0001 P <sub>2-3, 4, 5, 6</sub> <0,0001
α <sub>2</sub> - макроглобулин	16,65 ± 0,86	76,81 ± 6,84	13,50± 0,5	11,67± 0,38	9,26 ± 0,47	6,06 ± 0,27	P <sub>1-2, 4, 5, 6</sub> <0,0001 P <sub>2-3, 4, 5, 6</sub> <0,0001
Кислото-стабильные ингибиторы	10,39 ± 1,43	25,32 ± 2,19	12,90± 0,9	14,32± 1,32	21,57± 2,32	35,40± 2,2	P <sub>1-2</sub> <0,0001 P <sub>2-4</sub> <0,001 P <sub>2-6</sub> <0,002

Таким образом, рассматривая протеаз/антипротеазную систему бронхиального региона с позиций выявления протективных факторов ХОБЛ у «злостных курильщиков», очевидной представляется роль высокой активности антипротеазных систем. Вероятно, активизация антипротеаз при высокой концентрации протеаз (инициируемой факторами табачного дыма), обнаруживаемая у «злостных курильщиков», является одним из механизмов, предупреждающих развитие ХОБЛ.

Калликреин-кининовая система является ключевой системой организма, участвующей в регуляции широкого спектра физиологических функций орга-

низма. В рамках нашей работы определялась активность ККС в ИМ, что отражает процессы, протекающие непосредственно в очаге воспаления. Активность калликреина и калликреиногена в мокроте у здоровых некурящих и «злостных курильщиков» не отличались (табл.6).

При обострении ХОБЛ наблюдалась активация калликреин-кининовой системы в ИМ, проявляющаяся в увеличении активности как калликреина, так и его предшественника калликреиногена по отношению к здоровым некурящим и «злостным курильщикам». Активность кининогенеза контролируется ингибиторами протеиназ. Одним из главных ингибиторов протеиназ является  $\alpha_1$ -ПИ, определяющий 90% антипротеиназной активности плазмы крови. Активность  $\alpha_1$ -ПИ при ХОБЛ снижалась, достигая минимума на поздних стадиях заболевания. Снижение уровня ингибиторов ведет к неконтролируемой активации кининовой системы и, следовательно, способствует воспалительной реакции. У «злостных курильщиков» активность показателей ККС была ниже, по сравнению с больными ХОБЛ.

Таблица 6

Активность калликреина и калликреиногена в индуцированной мокроте у здоровых некурящих, «злостных курильщиков» (более 25 пачка/лет) и при обострении ХОБЛ ( $X \pm m$ )

Показатели (МЕ/мл)	Здоровые некурящие n=24	Злостные курильщики n=27	Больные ХОБЛ (стадии)				P
			I n=6	II n=18	III n=35	IV n=41	
			1	2	3	4	
Калликреин	10,0±0,9	8,0 ±0,4	19,0±1,2	26,1±1,2	28,5±3,1	24,6±2,8	P <sub>1-3</sub> <0,03 P <sub>1-4,5,6</sub> <0,02 P <sub>2-3</sub> <0,02 P <sub>2-4,5,6</sub> <0,001
Калликреиноген	34,5±4,9	32,6±0,2	37,3±3,1	43,9±4,0	49,5±4,2	50,7±2,1	P <sub>1-4,5,6</sub> <0,02 P <sub>2-4</sub> <0,002 P <sub>2-5,6</sub> <0,001

Таким образом, у «злостных курильщиков» вследствие низкой активности ККС не происходит инициации неконтролируемого воспаления в легочном регионе со всем каскадом последующих событий, приводящих в конечном итоге к деструктивным и фиброзным изменениям. Причинами низкой активности показателей ККС могут быть, во-первых, генетически детерминированный слабый ответ этой системы на экзогенный патогенный фактор (табачный дым), во-вторых, инактивация компонентов ККС антипротеиназами, количество которых у «злостных курильщиков» в бронхиальном регионе весьма высоко.

Исследование цитограмм индуцированной мокроты показывает, что у «злостных курильщиков» в бронхиальном регионе иницируется нейтрофильное воспаление. При ХОБЛ нейтрофильный характер воспаления сохраняется с нарастанием количества нейтрофилов и уменьшением числа макрофагов по мере прогрессирования заболевания.

В исследовании была поставлена задача изучения системных реакций нейтрофильно-макрофагального звена у «злостных курильщиков» и при ХОБЛ. Для этого был выбран метод исследования цитологических реакций в очаге асептического воспаления – «кожное окно», позволяющий оценить функцию макрофагов и нейтрофилов. У «злостных курильщиков» по сравнению с группой здоровых некурящих, в отпечатке «кожного окна» было меньшее количество макрофагов и преобладание нейтрофилов. Это наблюдалось как через 4 часа после скарификации, так и через 20 часов. При ХОБЛ всех стадий и во все фазы воспаления в асептическом очаге преобладали нейтрофилы. Кроме того, у «злостных курильщиков», как и у больных ХОБЛ, через 20 часов после скарификации не происходило смены нейтрофильного доминирования на макрофагальное.

Нейтрофильный характер воспаления в очаге удаленном от бронхиального региона, как у «злостных курильщиков», так и больных ХОБЛ, позволяет сделать вывод, что длительное курение инициирует экспрессию нейтрофильного пула при меньшей активности макрофагального звена. Вероятно, при генотипе толерантном к развитию ХОБЛ особенности нейтрофильного воспаления в бронхиальном регионе не реализуются как воспаление с запуском каскада патологических механизмов.

Часть работы была посвящена изучению влияния ирритативного фактора на клиническое течение и активность биомаркеров воспаления при обострениях ХОБЛ. Под наблюдением находились 103 больных ХОБЛ в период обострения, из которых 65 было курящими, 23 бывшими курящими, 15 никогда некурящими. Существенных различий по возрасту, длительности заболевания, типу обострения болезни между группами не было. Курящие и бывшие курящие больные ХОБЛ относились по длительности курения к злостным курильщикам. У большинства пациентов было ХОБЛ тяжелого течения (III – IV стадии).

Оценка эффективности лечения обострения больных ХОБЛ при всех степенях тяжести болезни показала регресс основных клинических симптомов и, соответственно, уменьшение клинического индекса, а также увеличение дистанции, проходимой пациентами в тесте с 6-минутной ходьбой. Не была выявлена динамика  $ОФВ_1$ .

Было исследовано влияние фактора курения (продолжающие курить, бывшие курящие и никогда некурящие) на клинику обострений ХОБЛ (табл.7).

Результаты демонстрируют отсутствие различий в значениях таких показателей как клинический индекс,  $ОФВ_1$ , дистанция в тесте с 6-минутной ходьбой между сравниваемыми группами, как в начальный период обострения, так и после его купирования.

Исследование морфофункциональных свойств нейтрофилов в сравниваемых группах выявило меньшую концентрацию гранул катионных протеинов в нейтрофилах индуцированной мокроты у бывших курящих в начальный период обострения. Содержание КП в нейтрофилах крови, как в обострение, так и после лечения, статистически ниже, чем у здоровых некурящих только в группе курящих больных.

Существуют разные точки зрения о клеточном составе мокроты у больных ХОБЛ в зависимости от факта курения.

Таблица 7

Динамика основных клинических показателей за период лечения обострений у больных ХОБЛ в зависимости от ирритативного фактора ( $X \pm m$ )

Группы пациентов с обострением ХОБЛ		Клинический индекс	ОФВ <sub>1</sub> (% от должных значений)	Дистанция в тесте с 6 мин. ходьбой (м)	
Курящие	n=65	до лечения	2,6±0,06	34,65±2,1	321,98±17,57
		после лечения	1,49±0,07 P <0,0001	38,36±2,7 P>0,05	366,95±20,14 P>0,05
Бывшие курящие	n=23	до лечения	2,56±0,12	33,0±5,6	332,53±24,3
		после лечения	1,44±0,14 P <0,0001	32,47±4,8 P>0,05	376,66±36,93 P>0,05
Некурящие	n=15	до лечения	2,53±0,2	38,2±4,3	352,8±20,5
		после лечения	1,16±0,09 P <0,0001	37,2±5,5 P>0,05	369,28±40,4 P>0,05

Некоторые авторы не находят различий в клеточном составе мокроты у курящих больных и бывших курящих [Grashoff WF, 1997; Turato G., 2002], а T.S. Larperre (2006, 2007) сообщает о том, что чем длительней абстинентный период у курильщиков, тем количество СД 8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов становится меньше. Ряд исследователей выявляют различия в клеточном составе мокроты указанных групп с уменьшением нейтрофилов и лимфоцитов у бывших курящих больных [Willemse BW., 2005]. Проведенный нами анализ цитограмм индуцированной мокроты сравниваемых групп не выявил каких-либо различий в процентном соотношении клеток. При ХОБЛ всех групп динамики в показателях цитологического состава индуцированной мокроты после курса терапии в сравнении со значениями до лечения выявлено не было.

Содержание МПО в нейтрофилах крови при обострении болезни было меньшим в группе никогда некурящих, по сравнению с курящими больными и больными, которые бросили курить. В стабильную фазу эти различия не определялись. Это связано с тем, что у некурящих больных после лечения повышалось содержание МПО в нейтрофилах крови, и в стабильную фазу этот показатель уже не отличается от группы «злостных курильщиков». Содержание миелопероксидазы в нейтрофилах мокроты, «кожного окна» при обострении ХОБЛ не зависело от фактора курения.

Активность калликреина была выше в группе некурящих больных по сравнению с группами, где больные курят или бросили курить. После лечения изменение активности КК во всех группах выявлено не было, и в ремиссию этот показатель продолжал оставаться выше группы контроля.

Исследование протеазной системы в бронхиальном регионе (табл.8,9) при обострении ХОБЛ показало, что активность эластазы в мокроте выше у никогда некурящих больных по сравнению с группой курящих больных. После курса терапии было снижение активности эластазы и ТПП у больных всех трех групп, при этом активность ТПП и эластазы в ремиссию по-прежнему превышала значения здоровых некурящих и «злостных курильщиков».

Таблица 8

Содержание эластазы и трипсиноподобных протеиназ (ТПП) в индуцированной мокроте у больных ХОБЛ в зависимости от ирритативного фактора ( $X \pm m$ )

Группы пациентов с обострением ХОБЛ			Показатели (нмольБАНЭ/мин мл)			
			Эластаза	Р	ТПП	Р
Курящие n= 65	до лечения	1	3,49±0,29	<0,001	5,58±0,40	<0,0001
	после лечения	2	0,87±0,15		3,32±0,26	
Бывшие ку- рящие n=15	до лечения	3	3,92±0,75	<0,001	5,64±0,74	<0,0001
	после лечения	4	1,05±0,45		3,72±0,47	
Некурящие n=13	до лечения	5	5,34±0,98	<0,05	7,52±1,07	<0,02
	после лечения	6	1,78±0,78		3,56±1,51	
Р			P <sub>1-5</sub> <0,04			

Терапия обострения болезни сопровождалась увеличением активности  $\alpha_1$ -ПИ и  $\alpha_2$ -МГ у больных всех групп относительно начального периода обострения. Наиболее выраженное повышение было в группе никогда некурящих больных. Активность  $\alpha_1$ -ПИ и  $\alpha_2$ -МГ в стабильный период у некурящих больных соответствовала значениям в контроле. У курящих и бывших курящих показатели антипротеазной защиты легких  $\alpha_1$ -ПИ и  $\alpha_2$ -МГ в ремиссию оставались ниже, чем у здоровых некурящих.

Таблица 9

Содержание ингибиторов протеиназ в индуцированной мокроте у больных ХОБЛ в зависимости от ирритативного фактора ( $X \pm m$ )

Группы пациентов с обострением ХОБЛ			Показатели (мИЕ/мл)					
			$\alpha_1$ - ПИ	Р	$\alpha_2$ - МГ	Р	КСИ	Р
Курящие n=63	до лече- ния	1	31,13± 4,14	<0,0001	8,61± 0,42	<0,0001	24,78± 2,00	<0,0001
	после лечения	2	74,7± 5,07		14,1± 2,1		18,1± 1,6	
Бывшие курящие n=17	до лече- ния	3	29,1± 9,09	<0,02	8,6± 1,03	<0,01	22,44± 3,95	<0,05
	после лечения	4	62,0± 9,6		12,8± 0,66		14,09± 1,09	
Некуря- щие n=12	до лече- ния	5	22,8± 9,96	<0,02	9,09± 1,67	<0,001	30,88± 5,28	<0,05
	после лечения	6	97,4± 6,42		19,6± 3,34		15,84± 6,35	
Р			P <sub>2,4-6</sub> <0,05		P <sub>4-6</sub> <0,05			

Таким образом, у никогда некурящих больных ХОБЛ, наряду с более высокой активностью эластазы в бронхиальном регионе при обострении, наблюдали и более значительный рост активности антипротеаз, по сравнению с субъектами, у которых развитию ХОБЛ предшествовало курение, либо продолжающих курить. Возможно, это указывает на более благоприятное течение болезни у никогда некурящих, либо на различные механизмы развития болезни у курящих и некурящих.

Отмечено снижение уровня кислотостабильных ингибиторов в мокроте после лечения обострений во всех группах, но влияние фактора курения на этот показатель нами не выявлено.

Нами не получены данные, свидетельствующие о влиянии курения при обострении ХОБЛ, на такие показатели оксидант/антиоксидантной системы как МДА, каталаза, СОД в индуцированной мокроте. Вместе с тем, имеются указания на уменьшение МДА у бывших курящих больных [Сюрин С.А., 2004; Sahin U., 2001; Isik B., 2005]. После курса терапии нами было констатировано снижение содержания МДА у курящих больных. При этом активность МДА в стабильную фазу у курящих и бывших курящих больных достигает значений группы «злостных курильщиков», превышая контрольную группу в 5 раз, а у некурящих больных этот показатель был по-прежнему выше, чем в группе контроля (в 7,7 раз) и «злостных курильщиков». После купирования обострения было получено повышение содержания каталазы только у курящих больных, но относительно других групп это повышение статистически значимо не отличалось. При этом активность каталазы в стабильную фазу у курящих и некурящих больных достигает группы контроля, а у бывших курящих остается ниже значений контрольной группы в 2,6 раза. Активность СОД индуцированной мокроты после курса лечения существенно не изменялась ни в одной группе больных ХОБЛ.

### **Выводы**

1. У «злостных курильщиков» без клинических и спирометрических признаков ХОБЛ (анамнез курения –  $34,9 \pm 1,4$  пачка/лет) в бронхиальном регионе, по сравнению с никогда некурящими, инициируется нейтрофильное воспаление характеризующееся:

- высоким содержанием в нейтрофилах индуцированной мокроты миелопероксидазы и катионных протеинов;
- высокой активностью в индуцированной мокроте протеолитических ферментов (эластазы, трипсиноподобных протеиназ), их ингибиторов ( $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора,  $\alpha_2$ -макроглобулина, кислотостабильных ингибиторов), повышенной концентрацией малонового диальдегида.

2. При длительном курении у «злостных курильщиков» изменяются хемотаксические характеристики нейтрофильного и макрофагального пулов лейкоцитов: в отпечатке «кожного окна» по сравнению с никогда некурящими через 4 часа после скарификации визуализируется большее количество нейтрофилов, а через 20 часов не происходит трансформации нейтрофильной фазы воспаления в макрофагальную. Цитоплазма нейтрофилов «кожного окна» у

«злостных курильщиков» содержит большее количество миелопероксидазы по сравнению со здоровыми некурящими.

3. Толерантность к развитию ХОБЛ у «злостных курильщиков» может поддерживаться уровнем ответной реакции на действие факторов табачного дыма, реализующейся в количественных значениях биомаркеров воспаления и морфофункциональных свойствах нейтрофилов, которые по сравнению с больными ХОБЛ характеризуются:

- более высокой активностью протеолитических ингибиторов –  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина, в 3-30 раз превышающих аналогичные значения у больных, и меньшей активностью протеиназ – эластазы и трипсиноподобных протеиназ в индуцированной мокроте;
- более низкими значениями активности калликреин-кининовой системы (каликреиногена, калликреина) в индуцированной мокроте;
- меньшим содержанием малонового диальдегида и более высокой активностью каталазы в индуцированной мокроте;
- большим количеством миелопероксидазы и катионных протеинов в цитоплазме нейтрофилов индуцированной мокроты.

4. При обострении ХОБЛ III-IV стадии у курящих, бывших курящих, никогда некурящих фактор курения не оказывает влияния на такие показатели как клинический индекс, ОФВ<sub>1</sub>, дистанцию, проходимую пациентом в тесте с 6-минутной ходьбой, и их динамику после купирования обострения.

5. Отказ от курения в течение  $6,0 \pm 1,8$  лет пациентов с ХОБЛ III-IV стадии, бывших злостных курильщиков, не влияет на количественные показатели биомаркеров воспаления в бронхиальном регионе и морфофункциональные свойства нейтрофилов, значения которых остаются на уровне больных ХОБЛ III-IV стадии, злостных курильщиков, продолжающих курение.

6. При ХОБЛ III-IV стадии у никогда некурящих пациентов количественные значения биомаркеров воспаления и морфофункциональные свойства нейтрофилов отличаются от данных у курящих и бывших курящих больных:

- более высокой активностью калликреина в индуцированной мокроте;
- более высокой активностью эластазы при обострении и более значительным ростом активности  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина в индуцированной мокроте после купирования обострения;
- более низкой концентрацией миелопероксидазы в нейтрофилах крови при обострении ХОБЛ и увеличением ее после купирования обострения.

### **Практические рекомендации**

1. Для контроля эффективности лечения обострений ХОБЛ рекомендуется использовать наиболее информативные клинические показатели: клинический индекс и дистанцию, проходимую пациентом в тесте с 6-минутной ходьбой.

2. Отказ от курения пациентов с ХОБЛ в качестве средства, уменьшающего прогрессирование болезни, должен происходить на ранних стадиях болезни.

3. При лечении табачной зависимости рекомендуется использовать данные настоящего исследования, указывающие на формирование при длительном курении воспаления с повреждающими легочные структуры компонентами, необходимость раннего отказа от курения, при котором сохраняется эффективность в отношении предупреждения болезни.

### **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 [и др.] // 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 [и др.] // 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 др.] // 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 Национальный 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 др.] // Естествознание и гуманизм: Сборник научных работ. – Томск: Изд-во СГМУ, 2005. – Том 2. – № 4. – С. 98.

6. Клиническая эффективность регулятора энергетического обмена «янтарь-антитокс» в лечении обострения хронической обструктивной болезни легких / М.С. Санжаровская, В.А.Хазанов, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина [и др.] // Естествознание 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 [и др.] // 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 др.] // 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. Ям-

кина, М.С. Санжаровская [и др.] // 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 [et al.] // *European Respiratory Journal*. – Vol. 28. – Suppl. 50. – Sept. 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 [et al.] // *European Respiratory Journal*. – Vol. 28. – Suppl. 50 – Sept. 2006. – S. 634.

12. Связь миелопероксидазной активности нейтрофилов и клинических характеристик обострений хронической обструктивной болезни легких / С.В. Федосенко, Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровской, Н.С. Ямкина [и др.] // *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. Санжаровской, Н.С. Ямкина [и др.] // *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. Relationship between inflammatory mediators in induced sputum and BODE-index in patients with COPD / M. Sanzharovskaya, G. Chernogoryuk, N. Varvyanskaya, N. Yamkina [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2007. – Vol. 30. – Suppl. 51. – P. 933.

15. Relationship between peroxidation and antioxidant status in induced sputum and BODE-index in patients with COPD / M. Sanzharovskaya, G. Chernogoryuk, N. Varvyanskaya, N. Yamkina [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2007. – Vol. 30. – Suppl. 51. – P. 929.

16. Possible mechanisms of protection of lung tissue in smokers without COPD / M. Sanzharovskaya, G. Chernogoryuk, N. Varvyanskaya, N. Yamkina [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2007. – Vol. 30. – Suppl. 51. – P. 924.

17. Протеиназ-антипротеиназная система бронхиального региона и значение DODE-индекса при хронической обструктивной болезни легких / М.С. Санжаровская, Н.В. Варвянская, А.А. Будкова, Н.С. Ямкина [и др.] // *Сборник трудов Томской областной клинической больницы. Выпуск 14* / под ред. Б.Т. Серых, Л.Г. Ленской. – Томск: изд-во ТПУ, 2007. – С. 50-51.

18. Эффективность терапии обострений хронической обструктивной болезни легких и биомаркеры воспаления / Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровская, Н.С. Ямкина [и др.] // *Уральский медицинский журнал*. – № 8. – 2007. – С. 17-20.

19. 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 др.] // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2008. – № 3. – С. 109-115.

20. 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.

21. 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.

### Список сокращений

ГКС – глюкокортикостероиды  
ИМ – индуцированная мокрота  
КП – катионный протеин

КИ – клинический индекс  
КСИ – кислотостабильные ингибиторы  
КО – «кожное окно»

МПО – миелопероксидаза  
МДА – малоновый диальдегид  
 $\alpha_2$ -МГ – альфа 2- макроглобулин  
 $\alpha_1$ -ПИ – альфа 1-протеиназный ингибитор  
ОФВ<sub>1</sub> – объем форсированного выдоха  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
СОД – супероксиддисмутаза

ТПП – трипсиноподобные протеиназы  
ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких  
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких  
GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease