

Изучение иммунологических показателей ротовой жидкости до и после провокации раствором сигаретного дыма для прогнозирования риска развития ХОБЛ

Т.Г. Гордиевич, О.В. Ищенко

Витебский государственный медицинский университет, Витебск

Study of immunological biomarkers of saliva before and after cigarette smoke extract exposure to predict the risk of developing COPD

T.H. Hardziyevich, A.U. Ishchanka

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Цель исследования. Изучение иммунологических показателей ротовой жидкости до и после провокации раствором сигаретного дыма для разработки модели прогнозирования вероятности риска развития хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ).

Материал и методы. Проведено обследование 84 респондентов старше 30 лет. Среди них 41 пациент с верифицированным диагнозом ХОБЛ II-III степени тяжести (критерии GOLD), группу сравнения составили 43 практически здоровых добровольца без обструктивной патологии дыхательных путей, 19 из которых (44,2%) имели отягощённый респираторный аллергологический анамнез (сезонный и круглогодичный аллергический ринит, конъюнктивит, лекарственная аллергия) и 24 (55,8%) практически здоровых добровольца. Были собраны и проанализированы анамнестические, клинические, лабораторные, инструментальные данные всех обследованных лиц. Участникам исследования проведён орально-буккально-фарингеальный полоскательный тест (ОБФПТ) с водным раствором сигаретного дыма (РСД). В образцах ротовой жидкости (РЖ), полученных до и после ОБФПТ с РСД методом иммуноферментного анализа определены уровни интерлейкина (ИЛ)-8, ИЛ-13, нейтрофильной эластазы (НЭ), миелопероксидазы (МПО), лактоферрина, лизоцима, лейкотриена В₄.

Результаты. Установлены различия в уровнях биомаркеров нейтрофильного и Т₂ воспаления в РЖ пациентов с ХОБЛ в сравнении с лицами без обструктивных заболеваний лёгких. У лиц с ХОБЛ в РЖ обнаружено повышение уровней лизоцима, лактоферрина, ИЛ-13 и снижение уровня миелопероксидазы. Обнаружены особенности иммунологического ответа после ОБФПТ с РСД у пациентов с ХОБЛ. После провокации у пациентов с ХОБЛ выявлен повышенный уровень нейтрофильной эластазы среди некурящих лиц по сравнению с курящими, а также между некурящими пациентами с ХОБЛ и некурящими лицами из группы сравнения, уровень ИЛ-8 также был достоверно выше у пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми респондентами без обструктивной патологии, кроме того

Summary

Aim. To study immunological biomarkers of saliva before and after cigarette smoke extract exposure to develop a model for predicting the likelihood of developing COPD.

Material and methods. A survey of 84 respondents over 30 years of age was conducted. Among them, 41 patients had a verified diagnosis of COPD grade II-III (GOLD), the comparison group consisted of 43 practically healthy volunteers without obstructive airway pathology, 19 of whom (44,2%) had an allergological history (seasonal and year-round allergic rhinitis, conjunctivitis, drug allergy) and 24 (55,8%) healthy volunteers. Anamnestic, clinical, laboratory, and instrumental data of all examined patients was collected and analyzed. In the saliva samples obtained before and after cigarette smoke extract (CSE) exposure, the levels of IL-8, IL-13, NE, myeloperoxidase (MPO), lactoferrin, lysozyme, and leukotriene B₄ were determined by enzyme immunoassay.

Results. Differences in the levels of neutrophilic and T₂ inflammation biomarkers in the saliva of patients with COPD compared to individuals without obstructive pulmonary diseases were established. In individuals with COPD, increased levels of lysozyme, lactoferrin, IL-13, and decreased levels of MPO were found in the saliva. Features of the immunological response after CSE exposure were found in patients with COPD. After CSE exposure in patients with COPD, an increased level of neutrophil elastase was detected among non-smokers compared to smokers, as well as between non-smoking patients with COPD and non-smokers from the control group. The level of IL-8 was also significantly higher in patients with COPD compared to healthy respondents without obstructive pathology. In addition, a significant increase in the level of MPO was found in the subgroup of non-smoking patients with COPD. Using multivariate regression analysis, the most significant factors associated with the probability of risk of developing COPD were established: smoking index, results of the COPD diagnostic questionnaire (CDQ), FEV₁, %, post-bronchodilator FEV₁, %, FEV₁/FVC, %, post-bronchodilator FEV₁/FVC ratio, %, gender, the difference in IL-8 values before/after CSE exposure. Based on

обнаружено достоверное увеличение уровня миелопероксидазы в подгруппе некурящих пациентов с ХОБЛ. С помощью многофакторного регрессионного анализа установлены наиболее значимые факторы, ассоциированные с вероятностью риска развития ХОБЛ: индекс курения, результаты стандартизованного опросника для диагностики ХОБЛ (COPD diagnostic questionnaire (CDQ)), ОФВ1, %, ОФВ1, постБД%, ОФВ1/ФЖЕЛ, %, ОФВ1/ФЖЕЛ, постБД%, пол, разница значений ИЛ-8 до/после ОБФПТ с РСД. На основе полученных данных разработана математическая модель, позволяющая прогнозировать вероятность риска развития ХОБЛ у лиц без обструктивной патологии лёгких. **Заключение.** Разработан комплексный метод прогнозирования риска развития нейтрофильного воспалительного эндотипа ХОБЛ на основе использования доступных анамнестических, клинико-диагностических и иммунологических данных, что позволит персонализировать подходы в ранней диагностике и профилактике ХОБЛ.

Ключевые слова

Прогнозирование, математическая модель, ROC-анализ, факторы риска, водный раствор сигаретного дыма, хроническая обструктивная болезнь лёгких, ротовая жидкость, слизистая оболочка полости рта, цитокины.

Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) является гетерогенным заболеванием, этиология которого определяется взаимосвязью факторов окружающей среды (в частности курением) и генетической предрасположенностью. Сигаретный дым является ключевым фактором риска развития ХОБЛ [1]. Недостаточная и поздняя диагностика является одной из самых больших проблем. ХОБЛ не диагностируют до тех пор, пока заболевание не проявит себя клинически и не достигнет умеренной стадии [2]. Более 70% пациентов с ХОБЛ имеют начальную стадию заболевания с лёгкими респираторными проявлениями или даже без них.

В обновлённом отчёте GOLD за 2024 год [1] подчёркивается значимость своевременной ранней диагностики и профилактики ХОБЛ, что, несомненно, требует необходимости разработки способа прогнозирования вероятности риска развития ХОБЛ.

Материал и методы

Одноцентровое открытое проспективное исследование выполнено на базе отделения пульмонологии учреждения здравоохранения «Витебская областная клиническая больница» и кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (ВГМУ) в 2023-2024 году. Исследование одобрено Этическим комитетом ВГМУ (протокол № 4 от 29.12.2017). Исследование выполнено при поддержке гранта БРФФИ «Наука-М» по договору № M23M-064 от 02.05.2023

the data obtained, a mathematical model was developed that allows predicting risks of developing COPD in individuals without obstructive pulmonary pathology.

Conclusions. A comprehensive method for predicting the risk of developing the neutrophilic inflammatory endotype COPD has been developed based on the use of available anamnestic, clinical diagnostic and immunological data, which will allow personalizing approaches to early diagnosis and prevention of COPD.

Keywords

Forecasting, mathematical model, ROC analysis, risk factors, cigarette smoke extract, chronic obstructive pulmonary disease, saliva, oral mucosa, cytokines.

и в рамках научно-исследовательской работы кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК «Разработка новых методов диагностики, лечения и медицинской профилактики аллергических и иммунодефицитных заболеваний», номер регистрации 20211042 от 06.05.2021.

Характеристика пациентов

В исследование включили 84 респондента старше 30 лет после подписания ими добровольного информированного согласия. Среди которых 41 пациент с верифицированным диагнозом ХОБЛ (критерии GOLD, клинический протокол диагностики и лечения хронической обструктивной болезни лёгких Министерства здравоохранения Республики Беларусь 05.07.2012 № 768 [3]). Группу сравнения составили 43 практически здоровых добровольца без обструктивной патологии дыхательных путей, 19 из которых (44,2%) имели отягощённый респираторный аллергологический анамнез (сезонный и круглогодичный аллергический ринит, конъюнктивит, лекарственная аллергия) и 24 (55,8%) практически здоровых добровольца.

Пациентам проводили общеклиническое обследование. Были собраны и проанализированы клинические (жалобы, объективный статус пациентов, вес, рост, анкетирование по опросникам (шкала одышки Британского медицинского исследовательского совета (modified Medical Research Council (mMRC) Dyspnea Scale, тест оценки ХОБЛ (COPD Assessment Test (CAT), клинический опросник по ХОБЛ (CCQ)), анамнестические (анкетирование

рование по стандартизованному опроснику для диагностики ХОБЛ Евразийской ассоциации терапевтов (COPD diagnostic questionnaire (CDQ)) [4], статус курения, аллерго- и иммунопатологический анамнезы), лабораторные (С-реактивный белок, уровень СОЭ, общий анализ крови, в том числе лейкоциты крови, лейкоцитарная формула), инструментальные (спирометрия с помощью спирографа МАС-2 с бронходилатационным тестом, измерен уровень сатурации крови).

Были оценены иммунологические показатели в ротовой жидкости (РЖ) до и после орально-буккально-фарингеального полоскательного теста (ОБФПТ) [5] с раствором сигаретного дыма (РСД), полученном с помощью собственного запатентованного устройства [6]. В супернатантах РЖ иммуноферментным методом определяли: интерлейкин (ИЛ)-8, ИЛ-13, нейтрофильную эластазу (НЭ), миелопероксидазу (МПО), лизоцим, лактоферрин (ЛФ), лейкотриен В4 (ЛТВ4). Обследование пациентов проводили через 1 неделю после отмены антигистаминных лекарственных препаратов (АГ) 2 поколения и внутривенных глюкокортикостероидов (ГКС). Пациенты с ХОБЛ получали лечение в соответствии с клиническим протоколом диагностики и лечения ХОБЛ Министерства здравоохранения Республики Беларусь 05.07.2012 № 768.

Клинико-демографическая характеристика обследованных представлена в таблице 1.

Участники исследования были однородны по возрасту, индексу Кетле (ИМТ, отношение массы тела в килограммах к длине тела в метрах, возведённой в квадрат). В то же время в группах были различия по половому показателю, среди обследованных в группе сравнения было 7 мужчин (16,3%) и 36 женщин (83,7%), среди пациентов с ХОБЛ было 36 мужчин (87,8%) и 5 женщин (12,2%). В группе пациентов с ХОБЛ было 24 (58,5%) активных курильщика и 17 (41,5%) некурящих пациентов. В группе сравнения было 15 (34,9%) активных курильщиков и 28 (65,1%) некурящих респондента. Между группами были достоверные различия по индексу курения (ИК), уровню насыщения крови кислородом, постбронходилатационным показателям: ОФВ1, ОФВ1/ФЖЕЛ ($p > 0,05$).

Полученные данные обрабатывали с помощью пакета прикладных таблиц «Statistica» (Version 10-Index, StatSoft Inc., США). При нормальном распределении ($p > 0,05$, для критерия Шапиро-Уилка во всех группах), результаты представляли в виде $M \pm \sigma$ (M – среднее значение, σ – стандартное отклонение), при ненормальном распределении ($p < 0,05$, для критерия Шапиро-Уилка во всех группах) результаты представлены в виде значений медиан (Me) с указанием нижнего 25-й (LQ) и верхнего 75-й квартилей (UQ).

Оценку статистической значимости различий при нормальном распределении проводили с

Таблица 1. Клинико-демографическая характеристика обследованных (Mediana [LQ; UQ], $M \pm \sigma$)

Показатель	ХОБЛ (n=41)	Группа сравнения (n=43)
Возраст, лет	51,6±4,9	49,3±7,9
Пол, мужчины/женщины	36/5*	7/36
Статус курения, активные курильщики**/некурящие***	24/17	15/28
ИК (пачка-лет) у активных курильщиков / ИК у некурящих	27,0 [15,0; 30,0]*/45,0 [30,0; 70,0]*	2,6 [2,0; 12,0]/0
Индекс Кетле, кг/м ²	26,6 [25,0; 27,6]	24,5 [21,1; 29,3]
ОФВ1, %	40,0 [32,0; 80,0]*	99 [91,0; 109,0]
ОФВ1/ФЖЕЛ, %	58,0 [39,0; 66,0]*	83,0 [80,0; 87,0]
Постбронходилатационный ОФВ1 %	42,0 [33,0; 87,0]*	100 [96,0; 110,0]
Постбронходилатационное ОФВ1/ФЖЕЛ, %	54,0 [36,0; 65,0]*	85,0 [82,0; 90,0]
SpO ₂ , %	96 [95; 97]*	99 [98; 99]
Опросник для диагностики ХОБЛ (CDQ), баллы	24,3±4,5*	8,2±3,1
Modified Medical Research Council (mMRC), баллы	2 [2; 3]	–
Тест оценки ХОБЛ (САТ), баллы	17,0 [13,0; 23,0]	–
Клинический опросник по ХОБЛ (CCQ), баллы	1,9 [1,6; 2,9]	–

Примечания: * – Достоверные различия в группах, $p < 0,05$; ** – Активный курильщик – лицо, которое в настоящее время курит сигареты ежедневно или нерегулярно. *** – Некурящий респондент – лицо, которое в настоящее время не курит. Включает «бывшего ежедневного курильщика» (в настоящее время некурящего, но ранее курившего ежедневно) и «никогда не курившего ежедневно» (в настоящее время некурящего и никогда не курившего ежедневно, напротив, курившего нерегулярно или вообще ни разу не курившего) словарь терминов Глобального опроса взрослого населения о потреблении табака (GATS), Российская Федерация. ИК – индекс курения. ИК (пачка-лет) = пачка-день * стаж курения, пачка-день = кол-во сигарет, выкуриваемых в день / 20. ОФВ1 – объём форсированного выдоха за первую секунду, ФЖЕЛ – форсированная жизненная ёмкость лёгких выдоха.

помощью t-критерия Стьюдента, при ненормальном распределении использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

Для оценки статистической значимости между двумя независимыми группами использовали критерий Манна-Уитни, критерий Вальда-Вольфовица, при сравнении трёх независимых групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), критерий Краскела-Уоллиса, хи-квадрат критерий. Для определения меры связи количественные параметров использовали анализ ранговой корреляции Спирмена.

Математическая модель прогноза вероятности риска развития ХОБЛ у курящих обследуемых из группы сравнения разработана на основе мультивариантной логистической регрессии. В качестве предикторов для математической модели рассматривались все выявленные факторы риска в разных сочетаниях. Выбор наилучшего варианта основывался на достижении максимальных уровней значимости коэффициентов логистической регрессии и максимальной диагностической точности.

Для отбора предикторов мультивариантной модели прогнозирования проводили моновариантный анализ. Для всех показателей рассчитывали отношение шансов (ОШ) с доверительным интервалом ($\pm 95\%$ ДИ) и уровень статистической значимости. Использовали метод пошагового включения предикторов. Относительный вклад отдельных предикторов определяли с помощью статистики Вальда (распределение χ^2), а также стандартизованного коэффициента регрессии. Точность модели оценивали с помощью индекса конкордации (c-index), который определялся площадью под кривой операционных характеристик (AUC). Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

При изучении показателей иммунитета (ИЛ-8, ИЛ-13, НЭ, МПО, лактоферрина, лизоцима, ЛТВ4) в РЖ у пациентов с ХОБЛ и в группе сравнения у пациентов без обструктивной патологии – среди практически здоровых лиц и аллергиков были получены следующие результаты (таблица 2).

Исходный уровень (проба 0) ИЛ-8 в ротовой жидкости между 3 группами пациентов достоверно различался ($p=0,04$; табл. 2). Различия были обусловлены исходно повышенным уровнем ИЛ-8 в РЖ у аллергиков, который составил 314,6 [285,3; 423,8] нг/л по сравнению со здоровыми лицами 269,2 [224,5; 307,7] нг/л ($p=0,009$). Уровень ИЛ-8 в РЖ у пациентов с ХОБЛ составил 310,7 [221,1; 387,3] нг/л, без достоверных различий между

группой пациентов с аллергопатологией ($p=0,3$) и практически здоровыми пациентами без обструктивной патологии ($p=0,1$). У курильщиков различий в уровне ИЛ-8 во всех 3-х группах не выявлено ($p=0,7$). Среди некурящих были различия: уровень ИЛ-8 в РЖ у здоровых некурящих ($n=17$) пациентов был достоверно ниже 272,4 [230,2; 311,1] нг/л ($p=0,04$), чем у некурящих аллергиков ($n=11$) 302,6 [285,3; 394,7] нг/л (рис. 1, а).

При анализе результатов показателя исходного уровня ИЛ-13 в РЖ между 3 группами пациентов выявлены статистически значимые различия ($p=0,003$). У пациентов с ХОБЛ уровень ИЛ-13 в РЖ исходно составил 44,5 [35,7; 52,7] нг/л и был достоверно выше, чем в группе пациентов с аллергопатологией ($p=0,02$). Различия в группах были связаны с некурящими пациентами ($p=0,04$). Среди курящих пациентов различий в группах не было (рис. 1, б).

При исследовании исходных показателей НЭ в РЖ между группами пациентов не было найдено достоверных различий ($p=0,9$; табл. 2). Не обнаружено различий также между курящими и некурящими респондентами (рис. 1, с).

У пациентов с аллергопатологией исходный уровень МПО в РЖ был достоверно выше ($p < 0,001$), чем у пациентов с ХОБЛ 1,2 [0,2; 1,9] нг/мл. Обнаружены различия в исходном уровне МПО в РЖ между группами как некурящих, так и курящих респондентов (рис. 1, d). Так, в группе некурящих аллергиков исходный уровень МПО составил 1,7 [1,3; 1,8] нг/мл и был достоверно выше ($p=0,009$), чем в группе некурящих пациентов с ХОБЛ 0,4 [0,1; 1,8] нг/мл, такие же результаты обнаружены и при сравнении здоровых некурящих пациентов, у которых исходно уровень МПО в РЖ составил 1,5 [1,2; 1,8] нг/мл и был достоверно выше, чем в группе некурящих лиц с ХОБЛ ($p=0,002$). Среди курильщиков во всех группах различий в уровне МПО не было.

При изучении исходного уровня ЛФ в РЖ между исследуемыми группами пациентов найдены статистически значимые различия ($p < 0,001$). Уровень ЛФ в РЖ у пациентов с ХОБЛ исходно составил 16,4 [10,9; 17,5] нг/мл и был достоверно выше ($p < 0,001$), чем у здоровых добровольцев без обструктивной патологии 10,7 [9,0; 15,8] нг/мл и группы аллергиков 10,0 \pm 4,7 нг/мл ($p < 0,001$). Между пациентами без обструктивной патологии не было найдено достоверных различий в исходном уровне ЛФ в РЖ ($p=0,4$). Исходный уровень ЛФ в РЖ у некурящих пациентов с ХОБЛ составил 16,5 [15,0; 17,9] нг/мл и был достоверно выше, чем в группе аллергиков, как некурящих 9,7 [8,6; 12,7] нг/мл ($p=0,004$), так и курильщиков 11,7

Таблица 2. Уровни ИЛ-8, ИЛ-13, нейтрофильной эластазы, миелопероксидазы, лактоферрина, лизоцима, лейкотриена В4 в ротовой жидкости до и после орально-буккально-фарингеального полоскательного теста с водным раствором сигаретного дыма (Me [LQ; UQ], M±σ)

Показатель	ХОБЛ (n=41)	Группа сравнения (n=43)		p между группами	
		Здоровые добровольцы (n=24)	Пациенты с аллергопатологией (n=19)		
ИЛ-8, нг/л	проба 0	310,7 [221,1; 387,3]	269,2 [224,5; 307,7]	314,6 [285,3; 423,8]	$p_{0 \text{ ХОБЛ-здор-алл}}=0,04$ $p_{0 \text{ алл-здор}}=0,009$
	проба 1	293,2 [212,2; 356,6]	197,4 [97,0; 269,0]	274,0 [220,8; 301,2]	$p_{1 \text{ ХОБЛ-здор}}=0,008$
	p между пробами	$p_{0-1}=0,9$	$p_{0-1}=0,0001$	$p_{0-1}=0,01$	–
ИЛ-13, нг/л	проба 0	44,5 [35,7; 52,7]	44,8±14,6	38,5±5,9	$p_{0 \text{ ХОБЛ-здор-алл}}=0,003$ $p_{0 \text{ ХОБЛ-алл}}=0,02$
	проба 1	40,8±14,2	32,4 [27,3; 43,5]	43,3±6,3	$p_{1 \text{ здор-алл}}=0,01$
	p между пробами	$p_{0-1}=0,3$	$p_{0-1}=0,008$	$p_{0-1}=0,04$	–
НЭ, нг/мл	проба 0	2,4 [0,7; 8,1]	2,1 [0,9; 5,6]	2,0 [0,7; 5,1]	–
	проба 1	3,3 [0,7; 10,8]	2,2 [1,0; 4,0]	3,4 [0,6; 4,2]	–
	p между пробами	$p_{0-1}=0,4$	$p_{0-1}=0,5$	$p_{0-1}=0,9$	–
МПО, нг/мл	проба 0	1,2 [0,2; 1,9]	1,6 [1,2; 1,9]	1,7±0,2	$p_{0 \text{ ХОБЛ-здор-алл}}=0,05$ $p_{0 \text{ ХОБЛ-алл}}<0,001$
	проба 1	1,7 [0,3; 1,9]	1,7 [1,6; 1,9]	1,7 [1,5; 1,9]	–
	p между пробами	$p_{0-1}=0,01$	$p_{0-1}=0,02$	$p_{0-1}=0,7$	–
ЛФ, нг/мл	проба 0	16,4 [10,9; 17,5]	10,7 [9,0; 15,8]	10,0±4,7	$p_{0 \text{ ХОБЛ-здор-алл}}<0,001$ $p_{0 \text{ ХОБЛ-здор}}<0,001$ $p_{0 \text{ ХОБЛ-алл}}<0,001$
	проба 1	14,3 [3,9; 17,8]	12,5 [8,2; 15,1]	10,3 [8,1; 13,9]	–
	p между пробами	$p_{0-1}=0,8$	$p_{0-1}=0,7$	$p_{0-1}=0,8$	–
Лизоцим, нг/мл	проба 0	18,8 [12,9; 23,1]	10,4±3,3	9,9±4,9	$p_{0 \text{ ХОБЛ-здор-алл}}<0,001$ $p_{0 \text{ ХОБЛ-здор}}=0,003$ $p_{0 \text{ ХОБЛ-алл}}<0,001$
	проба 1	15,9 [7,4; 25,3]	8,8±3,9	9,9±5,2	–
	p между пробами	$p_{0-1}=0,5$	$p_{0-1}=0,008$	$p_{0-1}=0,9$	–
ЛТВ4, нг/л	проба 0	146,6 [133,5; 161,4]	155,1 [138,9; 159,8]	154,5 [117,1; 164,7]	–
	проба 1	147,6 [84,9; 158,1]	139,7 [114,2; 142,7]	139,7 [107,9; 147,3]	–
	p между пробами	$p_{0-1}=0,5$	$p_{0-1}=0,0003$	$p_{0-1}=0,001$	–

Примечания: p_0 – достоверные различия между группами пациентов до орально-буккально-фарингеального полоскательного теста (ОБФПТ), $p<0,05$; p_{0-1} – достоверные различия в группах пациентов до/после ОБФПТ, $p<0,05$; p_1 – достоверные различия между группами пациентов после ОБФПТ, $p<0,05$; Проба 0 – исходные уровни показателей в ротовой жидкости; проба 1 – показатели в ротовой жидкости после ОБФПТ. ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь лёгких; ИЛ-8 – интерлейкин-8, ИЛ-13 – интерлейкин-13; НЭ – нейтрофильная эластаза; МПО – миелопероксидаза; ЛФ – лактоферрин; ЛТВ4 – лейкотриен В4.

[3,7; 15,2] нг/мл ($p=0,003$) (рис. 1, е). Уровень ЛФ у некурящих лиц с ХОБЛ был достоверно выше ($p=0,01$), чем у некурящих здоровых лиц 10,7 [9,4; 15,8] нг/мл. У курящих пациентов с ХОБЛ уровень ЛФ в РЖ исходно был достоверно выше

16,1 [10,1; 17,4] нг/мл, чем у курящих аллергиков 11,7 [3,7; 15,2] нг/мл ($p=0,02$).

Уровень лизоцима в РЖ исходно достоверно различался между 3 группами пациентов ($p<0,001$). У пациентов с ХОБЛ он был досто-

верно выше ($p=0,003$), чем в группе сравнения ($p<0,001$). Между лизоцимом и ЛФ в группе ХОБЛ найдена прямая умеренная корреляция ($R=0,690$). Исходный уровень лизоцима в РЖ у пациентов с аллергопатологией достоверно не отличался от уровня лизоцима в РЖ здоровых лиц без обструктивной патологии ($p=0,5$). У некурящих пациентов с ХОБЛ уровень лизоцима в РЖ исходно составил $19,5 [16,3; 24,5]$ нг/мл и был достоверно выше, чем в группе аллергиков, как некурящих $10,7 [7,2; 12,1]$ нг/мл ($p=0,0003$), так и курильщиков $8,1 [6,0; 10,6]$ нг/мл ($p=0,0001$) (рис. 1, f). Сходная картина наблюдалась и между некурящими лицами с ХОБЛ и группой здоровых добровольцев без обструктивной патологии. У курящих здоровых респондентов уровень лизоцима в РЖ исходно составил $9,5 \pm 2,2$ нг/мл и был достоверно ниже ($p=0,0001$), чем у некурящих пациентов с ХОБЛ. У некурящих здоровых лиц уровень лизоцима в РЖ исходно был также достоверно ниже $10,8 \pm 3,6$ нг/мл ($p=0,0003$), чем в группе некурящих лиц с ХОБЛ. Среди курильщиков с ХОБЛ исходно уровень лизоцима был достоверно выше $15,8 [8,5; 23,1]$ нг/мл, чем у курящих аллергиков ($p=0,009$) и некурящих здоровых лиц ($p=0,03$).

При исследовании исходного уровня ЛТВ4 в РЖ в группе пациентов с ХОБЛ и в группе сравнения среди пациентов, не имеющих обструктивной патологии, не было найдено достоверных различий ($p=0,8$). Между пациентами из группы сравнения не было найдено достоверных различий в исходном уровне ЛТВ4 в РЖ ($p=0,9$). Исходно по уровню ЛТВ4 в РЖ были достоверные различия между курящими пациентами с ХОБЛ $146,5 [128,5; 161,4]$ нг/л и курящими аллергиками (рис. 1, g), в группе последних уровень ЛТВ4 был достоверно выше $155,2 [136,7; 163,7]$ нг/л ($p=0,02$).

Результаты орально-буккально-фарингеального полоскательного теста с водным раствором сигаретного дыма

После провокации РСД у пациентов с ХОБЛ изменений уровня ИЛ-8 не было ($p_{0,1}=0,9$, табл. 1). В то же время в группах лиц без обструктивной патологии наблюдали снижение уровня ИЛ-8: на 27% от исходного показателя ($p=0,0001$) в группе здоровых лиц, на 13% ($p=0,01$) в группе пациентов с аллергопатологией. Достоверные различия в результате теста получены между группами ХОБЛ и здоровыми лицами ($p=0,008$). В подгруппе здоровых курильщиков уровень ИЛ-8 достоверно снизился на 64% ($p=0,02$) и составил $110,0 [42,4; 273,5]$ нг/л, что привело к различиям с группами ($p_{\text{кур.здор-кур.ХОБЛ}}=0,02$; $p_{\text{кур.здор-кур.алл}}=0,007$). Уровень

ИЛ-8 у курильщиков с ХОБЛ, как и у курильщиков с аллергопатологией, достоверно не изменился.

После провокации РСД среди курильщиков также различий в уровне ИЛ-13 в РЖ обнаружено не было. При попарном сравнении до и после провокации РСД обнаружены различия в уровне ИЛ-13 в РЖ в группе здоровых лиц в целом (уровень ИЛ-13 ротовой жидкости снизился на 28%; $p=0,008$), так же как среди курильщиков (15%; $p=0,02$), так и некурящих респондентов ($p=0,03$). Противоположный результат получен в группе аллергиков. В группе аллергиков уровень ИЛ-13 в РЖ увеличился на 25% за счёт курящих лиц и составил $46,8 [39,1; 50,1]$ нг/л ($p=0,01$).

После провокации РСД произошло достоверное снижение уровня НЭ в группе некурящих аллергиков на 27%, она составила $2,6 [0,6; 3,5]$ нг/мл ($p=0,03$). В группе курящих аллергиков обнаружена статистическая тенденция ($p=0,07$) к повышению уровня НЭ в РЖ после провокации РСД. В остальных группах пациентов не обнаружено динамических изменений уровня НЭ после ОБФПТ с РСД. Однако после ОБФПТ был обнаружен достоверно повышенный уровень НЭ внутри группы у некурящих лиц с ХОБЛ $6,0 [0,8; 13,7]$ нг/мл по сравнению с курильщиками $2,6 [0,7; 4,3]$ нг/мл. Также статистически повышенный уровень НЭ после РСД был обнаружен между некурящими лицами с ХОБЛ и группами сравнения, как между некурящими здоровыми респондентами $2,4 [1,1; 3,9]$ нг/мл ($p=0,01$), так и между некурящими аллергиками $2,6 [0,6; 3,5]$ нг/мл ($p=0,02$).

После провокации РСД при попарном сравнении внутри групп произошло увеличение уровня МПО РЖ в 2 группах некурящих респондентов. В группе некурящих здоровых лиц уровень МПО увеличился на 13% и составил $1,7 [1,6; 1,9]$ нг/мл, у некурящих пациентов с ХОБЛ уровень МПО в РЖ увеличился на 225% и составил $1,3 [0,3; 2,0]$ нг/мл ($p=0,02$). В группе аллергиков не обнаружено динамических изменений уровня МПО в РЖ после провокации РСД $1,7 [1,5; 1,8]$ нг/мл ($p=0,9$).

После провокации РСД не было обнаружено динамических изменений уровня ЛФ в группах пациентов, однако уровень ЛФ в РЖ у курящих аллергиков $8,7 [5,4; 14,5]$ нг/мл после ОБФПТ был достоверно ниже ($p=0,04$), чем у здоровых курящих пациентов $14,3 [6,1; 15,8]$ нг/мл.

После провокации РСД произошло снижение уровня лизоцима в группе здоровых курящих респондентов $8,9 \pm 4,2$ нг/мл ($p=0,02$).

После ОБФПТ с РСД произошло достоверное снижение уровня ЛТВ4 в группе сравнения, как

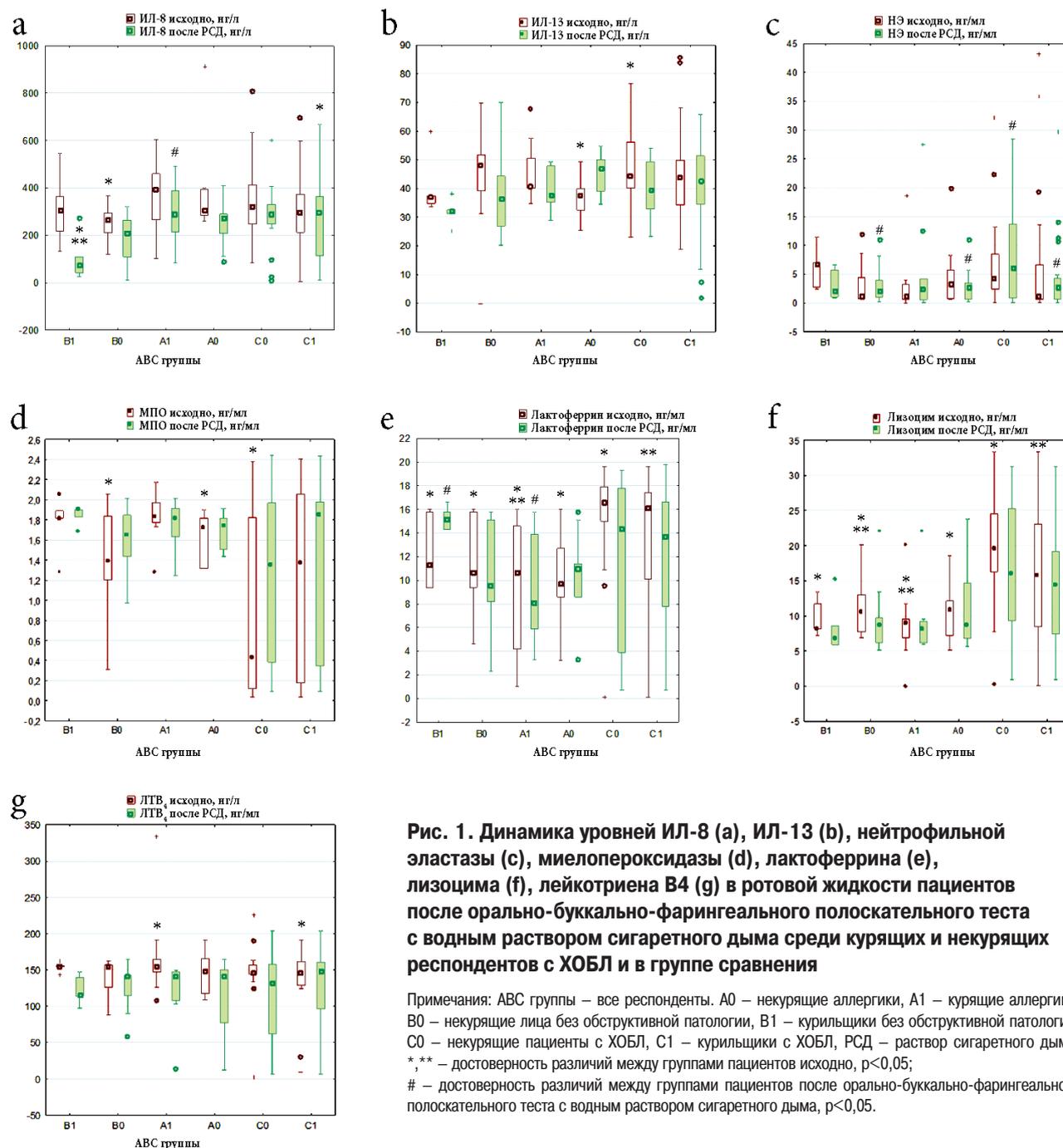


Рис. 1. Динамика уровней ИЛ-8 (а), ИЛ-13 (б), нейтрофильной эластазы (с), миелопероксидазы (д), лактоферрина (е), лизоцима (ф), лейкотриена В4 (г) в ротовой жидкости пациентов после орально-буккально-фарингеального полоскательного теста с водным раствором сигаретного дыма среди курящих и некурящих респондентов с ХОБЛ и в группе сравнения

Примечания: ABC группы – все респонденты. А0 – некурящие аллергики, А1 – курящие аллергики; В0 – некурящие лица без обструктивной патологии, В1 – курящие лица без обструктивной патологии; С0 – некурящие пациенты с ХОБЛ, С1 – курящие пациенты с ХОБЛ, РСД – раствор сигаретного дыма; *, ** – достоверность различий между группами пациентов исходно, $p < 0,05$; # – достоверность различий между группами пациентов после орально-буккально-фарингеального полоскательного теста с водным раствором сигаретного дыма, $p < 0,05$.

среди курящих, так и некурящих лиц. У здоровых курящих без обструктивной патологии уровень ЛТВ₄ в РЖ после провокации снизился на 27% и составил 114,2 [103,5; 140,0] нг/л ($p=0,02$), в группе некурящих здоровых лиц без обструктивной патологии уровень ЛТВ₄ в РЖ снизился на 10% ($p=0,03$) и составил 114,2 [103,5; 140,0] нг/л. В группе курящих аллергиков также наблюдали достоверное снижение уровня ЛТВ₄ после ОБФПТ с РСД ($p=0,02$), он снизился на 10% и составил 139,3 [118,9; 143,7] нг/л, сходные показатели получены и среди некурящих аллер-

гиков, у которых также произошло достоверное снижение ЛТВ₄ на 5% ($p=0,03$), он составил 139,7 [77,1; 149,9] нг/л.

Обсуждение результатов

В зависимости от различных предрасполагающих факторов, патогенеза, клинического фенотипа и тяжести течения ХОБЛ можно разделить на различные эндотипы. В настоящее время выделяют три воспалительных эндотипа ХОБЛ: нейтрофильное воспаление, эозинофильное воспаление и смешанное клеточное воспаление.

Среди них нейтрофильное воспаление является наиболее распространённым воспалительным эндотипом при ХОБЛ [7].

Опираясь на предыдущие работы по изучению патогенеза ХОБЛ, для исследования нами выбраны различные гуморальные факторы системы иммунитета ротовой полости. А именно, ферменты врождённого иммунитета (лизоцим и лактоферрин), гуморальные факторы, связанные с нейтрофильным воспалением (ИЛ-8, МПО, НЭ, ЛТВ4) и T2 воспалением – ИЛ-13.

Впервые нами обнаружены различия изучаемых параметров у пациентов с ХОБЛ в сравнении с пациентами без обструктивной патологии (рис. 2).

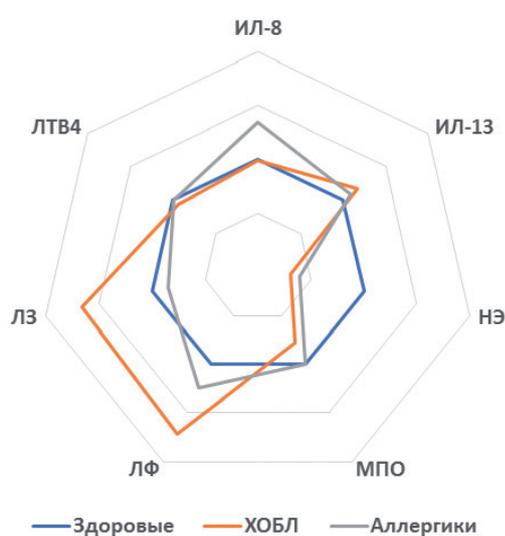


Рис. 2. Диаграмма сравнения исходных уровней ИЛ-8, ИЛ-13, нейтрофильной эластазы, миелопероксидазы, лактоферрина, лизоцима, лейкотриена В4 в ротовой жидкости у пациентов с ХОБЛ и в группах сравнения

Примечания: Уровни гуморальных факторов в ротовой жидкости у здоровых лиц приняты за 100%. ИЛ-8 – интерлейкин-8, ИЛ-13 – интерлейкин-13; НЭ – нейтрофильная эластаза; МПО – миелопероксидаза; ЛФ – лактоферрин; ЛТВ4 – лейкотриен В4.

Уровни лактоферрина и лизоцима в РЖ у пациентов с ХОБЛ были значительно выше по сравнению с группами лиц без обструктивной патологии.

Лизоцим и лизоцимоподобные ферменты обладают антимикробными эффектами и действуют путём деградации пептидогликанов клеточной стенки бактерий, что приводит к гибели клеток, а также могут подавлять грибки, дрожжи и вирусы [8]. Помимо своей прямой антимикробной активности, лизоцим также является важным компонентом врождённой иммунной системы у большинства млекопитающих. В условиях *in vitro*

показан синергизм действия лизоцима и других неспецифических факторов защиты (лактоферрина, пероксидазной системы слюны), а также sIgA. Установлено, что у лиц с непереносимостью стоматологических материалов понижается содержание лизоцима в сыворотке крови и слюне [9].

Недавно исследования выявили противоречивую активность лизоцима в различных типах опухолей, потенциально посредством его иммуномодулирующей активности. Лизоцим стимулирует провоспалительный иммунный ответ. Способность лизоцима гидролизовать пептидогликаны напрямую влияет на выработку паттерн распознающих рецепторов NOD (нуклеотид-связывающий домен олигомеризации) и толл-подобных рецепторов (TLR), которые, активируя ядерный фактор NF-κB, стимулируют сильный провоспалительный цитокиновый ответ (фактор некроза опухоли-альфа (TNF-α), ИЛ-6, ИЛ-12 и интерфероны (IFN)) с усилением активности нейтрофилов [10]. Эффект от использования лизоцима в качестве дополнения к стандартной терапии ХОБЛ существенно не отличался от эффекта плацебо и оказался недостаточным для предотвращения обострения ХОБЛ [11].

ЛФ является членом семейства трансферринов железосвязывающих гликопротеинов. У взрослых ЛФ синтезируется железистыми эпителиальными клетками и секретруется во внешние жидкости слизистых оболочек. В кровеносной системе ЛФ экспрессируется, в частности, в развивающихся нейтрофилах на стадии созревания миелоцитов и хранится во вторичных гранулах этого типа клеток [12]. В настоящее время описано несколько биологических функций ЛФ, включая гомеостаз железа, клеточный рост и дифференциацию, защиту хозяина от микробной инфекции, противовоспалительную активность и защиту от рака [13–15]. Известно, что ЛФ повышается при воспалительных заболеваниях, включая нейродегенеративные заболевания, воспалительные заболевания кишечника, аллергические заболевания кожи и лёгких, артрит [12]. Описана способность ЛФ взаимодействовать со специфическими рецепторами на многих иммунных клетках, включая нейтрофилы, моноциты, макрофаги и лимфоциты, предполагают, что противовоспалительная активность ЛФ может быть результатом прямого воздействия на модуляцию продукции цитокинов этими клетками через опосредованные рецепторами сигнальные пути [12]. Дегрануляция нейтрофилов в ответ на воспалительные сигналы вводит лактоферрин в среду, в которой присутствуют клетки как есте-

ственного врождённого (макрофаги, дендритные клетки, НК-клетки), так и адаптивного иммунного ответа (Т- и В-лимфоциты). Открытие лактоферриновых рецепторов на широком спектре иммунных клеток и их способность связывать лактоферрин подтверждает возможность этой молекулы функционировать таким образом, чтобы модулировать реакции как врождённого, так и адаптивного иммунного ответа [9]. Значительная локализация ЛФ во внешних жидкостях организма давно зародила предположение о том, что этот белок может играть решающую роль в поддержании среды, свободной от патогенов, на поверхности слизистых оболочек. Кроме того, как белок, полученный из нейтрофилов в большом количестве, ЛФ может быстро мобилизоваться для содействия защитному ответу хозяина в местах инфекции по всему телу [12].

Одним из важнейших свойств ЛФ является посредничество в процессе хелатирования, что снижает перегрузку железом, потенциально вредную, поскольку железо может отдавать электроны кислороду, что приводит к образованию активных форм кислорода (ROS), таких как супероксидные анионы и гидроксильные радикалы. Связываясь с железом, ЛФ одновременно снижает его доступность для патогенов, которые зависят от него для своего роста. Другим антиоксидантным эффектом, описанным для ЛФ, является его потенциал противодействовать явлению, известному как кислородный взрыв в нейтрофилах, вызывая выработку большого количества свободных радикалов, которые повреждают клетки и ткани [16]. Антимикробные свойства ЛФ были подтверждены данными *in vitro* и растущим числом исследований *in vivo* [17–19]. Резюмируя вышесказанное, становится понятным, что способность этого белка действовать как антимикробный агент широкого спектра действия обусловлена обладанием несколькими различными антимикробными свойствами [12].

Данные, полученные нами при изучении активности ферментов врождённого иммунитета (лизоцима и лактоферрина), свидетельствуют о наличии местной повышенной воспалительной реакции врождённого мукозального иммунитета слизистой оболочки полости рта (СОПР) у пациентов с ХОБЛ, которая с одной стороны отражает хроническое бронхолёгочное воспаление и обструкцию, и, вероятно, является «маркером» инфекционного обострения при ХОБЛ, а с другой является «хроническим» ответом СОПР от патогенов.

Обнаружен исходно повышенный уровень ИЛ-8 в ротовой жидкости у некурящих пациен-

тов с аллергопатологией по сравнению с некурящими практически здоровыми добровольцами и отсутствие достоверных различий с группой пациентов с ХОБЛ, что может свидетельствовать о преобладании повышенной воспалительной «нейтрофильной» иммунной реакции местного врождённого иммунитета СОПР у данных пациентов, и вероятно отражать повышенный иммунный ответ лёгких, а также представлять собой потенциальный прогностический маркер, предрасполагающий к развитию хронической обструктивной патологии в будущем.

ИЛ-8 (CXCL8) является членом семейства хемокинов CXС и секретируется макрофагами, эпителиальными и эндотелиальными клетками. ИЛ-8 является селективным хеоматтрактантом для нейтрофилов, привлекающих последних в очаг воспаления с последующей их дегрануляцией и выбросом медиаторов воспаления. Повышенные уровни наблюдаются в дыхательных путях, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, мокроте, лёгочной ткани и образцах крови пациентов с ХОБЛ [20]. ИЛ-8 может усиливать экспрессию MUC5AC напрямую или косвенно, вызывая секрецию нейтрофильной эластазы из нейтрофилов, что приводит к перепроизводству муцина и обструкции дыхательных путей. Повышенный синтез ИЛ-8 при ХОБЛ также обусловлен ускоренным или преждевременным клеточным старением. Стареющие клетки метаболически активны и могут влиять на другие клетки посредством секреции множества воспалительных белков, в том числе и хемокина CXCL8, что описано как секреторный фенотип, связанный со старением (SASP). Реакция SASP активируется p21CIP1, что приводит к активации митоген-активируемой протеинкиназы (MAP) p38 и Янус-активируемых киназ (JAK). Это приводит к активации ядерного фактора-кВ (NF-кВ) и секреции провоспалительных цитокинов, хемокинов, факторов роста, матриксных металлопротеиназ, уровень которых увеличивается при возрастных заболеваниях, включая ХОБЛ. Компоненты SASP различаются в зависимости от типа клеток и индуцирующих факторов, но, тем не менее, вносят важный вклад в воспаление низкой степени тяжести, наблюдаемое при многих хронических заболеваниях лёгких. Это также может объяснить повышенную базовую секрецию медиаторов воспаления, характерную для хронических заболеваний лёгких, таких как ХОБЛ [21]. В перспективе нейтрализация хемокиновых рецепторов CXCL8 на клетках может быть многообещающей в предотвращении развития ХОБЛ [22].

С одной стороны, повышенный уровень ИЛ-8 в РЖ обеспечивает врождённый иммунный ответ на инвазивные патогены, а с другой, может приводить к повреждению тканей и развитию так называемого «порочного круга». Повышенный уровень ИЛ-8 в РЖ может быть рассмотрен как маркер имеющегося «нейтрофильного воспаления» СОПР у пациентов с аллергопатологией.

Выявлен исходно повышенный уровень ИЛ-13 в ротовой жидкости в подгруппе некурящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с некурящими аллергиками без обструктивной патологии, что может свидетельствовать об участии в патогенезе ХОБЛ Т2 иммунного воспаления.

ИЛ-13 обнаруживается в Т-лимфоцитах, тучных клетках, эозинофилах, базофилах и макрофагах и участвует в синтезе муцина, привлечении клеток воспаления из крови в лёгочную ткань, а также регуляции действия матриксных металлопротеиназ [23]. При исследовании бронхоальвеолярной лаважной жидкости пациентов с ХОБЛ выявлено, что CD4+ и CD8+ Т-клетки экспрессируют значительно более высокий процент ИЛ-13, чем курильщики с нормальной функцией лёгких и никогда не курившие [24]. Как в однофакторном, так и в многофакторном анализе увеличение концентрации ИЛ-13 в плазме крови было связано с увеличением тяжести обструкции дыхательных путей (ОФВ1, % или DLCO, %), что позволяет предположить, что ИЛ-13 может быть важным медиатором при ХОБЛ [25].

Обнаружен исходно сниженный уровень МПО в РЖ у некурящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с некурящими респондентами из группы сравнения.

Ген, кодирующий человеческую МПО, содержит двенадцать экзонов и расположен на 17q22 хромосоме [26]. МПО является продуктом как нейтрофилов, так и макрофагов, в основном хранится в первичных гранулах нейтрофилов. Это воспалительный медиатор, который активируется во время воспалительной реакции и может ускорять её. Применение ингибиторов МПО предотвращало развитие эмфиземы и ремоделирование мелких дыхательных путей на животной модели ХОБЛ [27]. Как было сказано выше, МПО является продуктом нейтрофилов, а нейтрофилы в свою очередь являются первой линией защиты хозяина от патогенов, поскольку они в большом количестве привлекаются к месту инфекции. Поэтому отсутствие нейтрофилов или нарушение активации нейтрофилов может привести к тяжёлым инфекциям. Наиболее распространённым патогеном у пациентов с нейтропенией или

специфическими нарушениями функции нейтрофилов является *S. aureus*. *S. aureus* блокирует активацию нейтрофилов, распознавание образ-распознающими рецепторами (PRR) и производит золотистый пигмент с антиоксидантными свойствами для защиты от повреждения активными формами кислорода (ROS) внутри фагосомы. Хотя *S. aureus* нейтрализует почти всё «оружие» нейтрофилов, здоровые люди могут справиться с этой бактерией довольно эффективно [28].

В группе сравнения исходно наблюдается повышенный «нейтрофильный» иммунный ответ СОПР, определяемый по маркеру активации нейтрофилов – уровню МПО, который достоверно выше, чем у пациентов с ХОБЛ.

Обнаружен исходно повышенный уровень ЛТВ4 у курящих аллергиков по сравнению с курящими лицами с ХОБЛ.

ЛТВ4 является мощным провоспалительным медиатором, который синтезируется в основном нейтрофилами периферической крови, альвеолярными макрофагами и моноцитами. Его действие включают хемотаксис и хемотаксис нейтрофилов и эозинофилов, хемотаксис моноцитов, агрегацию нейтрофилов и усиление экспрессии рецепторов комплемента на гранулоцитах. ЛТВ4 способствует высвобождению лизосомальных ферментов из нейтрофилов, увеличению выработки ИЛ-6 моноцитами и адгезии нейтрофилов к эндотелиальной клетке. Повышенная продукция ЛТВ4 нейтрофилами наблюдается у пациентов с аллергическим ринитом, у детей и взрослых, страдающих астмой, во время её обострения, также при заболеваниях, связанных с нейтрофильным воспалением [29].

Динамика показателей после орально-буккально-фарингеального полоскательного теста с раствором сигаретного дыма

После проведения ОБФПТ с РСД нами обнаружены динамические изменения уровня ферментов врождённого иммунитета в ротовой полости: снижение уровня лизоцима в группе здоровых курящих респондентов, пониженный уровень ЛФ у курящих аллергиков, гуморальных факторов, связанных с нейтрофильным воспалением: снижение уровня ИЛ-8 и ЛТВ4 в группе сравнения, снижение уровня НЭ у некурящих аллергиков и повышенный уровень НЭ внутри группы пациентов с ХОБЛ, увеличение уровня МПО у некурящих здоровых лиц из группы сравнения и некурящих пациентов с ХОБЛ, медиатора связанного Т2 воспалением – ИЛ-13, снижение в группе сравнения среди здоровых лиц и увеличение среди аллергиков.

Сигаретный дым (СД) содержит более 7000 компонентов, включая никотин, альдегиды, полициклические ароматические углеводороды, гликопротеины и металлы, которые, как известно, являются как антигенными, так и канцерогенными. У людей воздействие первичного и, возможно, вторичного СД может привести к ХОБЛ и раку, а также потенциально привести к развитию астмы и сердечно-сосудистых заболеваний. Даже у некурящих людей, длительное время подвергающихся воздействию вторичного табачного дыма или дыма от сжигания биомассы, может развиваться бронхит, приводящий к ХОБЛ [30].

Исследование *in vitro* на линии HSC-2 эпителиальных клеток полости рта человека показало, что никотин (10^{-8} – 10^{-3} М), в течение короткого времени (24 часа), оказывает подавляющее действие на выработку воспалительных медиаторов, в том числе ИЛ-8 и ICAM-1, индуцированных ЛПС или ФНО α . Такое действие никотина указывает на то, что он может служить противовоспалительным средством. Тем не менее, никотин также ингибировал b-дефензин, индуцированный *Porphyromonas gingivalis* LPS, что свидетельствует о том, что он может допускать чрезмерный рост и инвазию потенциальных возбудителей пародонта. Важно отметить, что никотин не влиял на пролиферацию/жизнеспособность HSC-2 в этом диапазоне концентраций. Никотин может оказывать сильное токсическое действие на различные типы клеток при концентрации выше 10^{-3} М. Вероятно, микробиом полости рта может регулировать действие никотина [31].

Кроме того, никотин регулирует уровень цитокинов опосредованно иммунными клетками. На сегодняшний день иммунные факторы регулируемые никотином, в основном включают TNF- α , ИЛ-6, ИЛ-1b, простагландин E 2 (PGE2), оксид азота (NO), ЛТВ4, интерферон-гамма (ИФН- γ), ИЛ-17, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-4, ИЛ-1, ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-23, ИЛ-25, ИЛ-1 α , хемокин CXCL2, цитокины гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), CCR2 и b-дефензин [31].

Никотин, как компонент сигаретного дыма, обладает иммуносупрессивными эффектами и может приводить к снижению выработки провоспалительных цитокинов, включая ИЛ-8, что, в свою очередь, может привести к вторичной местной иммунной недостаточности, угнетению мукозального иммунитета СОПР, с последующим вероятным снижением хемотаксиса нейтрофилов и макрофагов к очагу воспаления, длительной

персистенции патогена, развитию острой и/или обострению хронической респираторной патологии, и последующим повышенным риском развития ХОБЛ у пациентов из группы риска.

У пациентов с ХОБЛ, вероятно, формируется «хронический нейтрофильный воспалительный ответ» местного врождённого иммунитета и изменения уровня ИЛ-8 в РЖ не происходит, о чём свидетельствует повышенный уровень ИЛ-8 в данной группе пациентов после ОБФПТ с РСД по сравнению со здоровыми лицами без obstructивной патологии.

У пациентов с аллергопатологией уровень ИЛ-8 в РЖ после ОБФПТ не отличается от уровня ИЛ-8 при ХОБЛ, что может свидетельствовать о развитии нейтрофильного иммунного ответа СОПР в ответ на провокацию поллютантом, такой патологический иммунный ответ может приводить к развитию хронической респираторной патологии в будущем.

Динамические изменения уровня ИЛ-8 в ротовой жидкости после ОБФПТ с РСД отражают иммуносупрессивный эффект РСД, сопровождающийся снижением уровня ИЛ-8 в ротовой жидкости. Вероятно, такой путь врождённого мукозального иммунологического ответа СОПР может привести к формированию «иммунодефицитного» варианта ХОБЛ в будущем.

Увеличение уровня ИЛ-13 в группе пациентов с аллергопатологией после провокации сигаретным дымом указывает вовлечение T2 иммунного воспалительного ответа в ответ на действие поллютанта у данной категории лиц.

Дегрануляция нейтрофилов с последующим выбросом МПО, с одной стороны, является защитной реакцией врождённого иммунитета ротовой полости у здоровых лиц, а с другой, у пациентов с ХОБЛ обуславливает поддержание хронического «нейтрофильного» воспаления дыхательных путей.

Построение математической модели прогнозирования вероятности риска развития ХОБЛ

Существующие кандидаты на роль респираторных биомаркеров неспецифичны и в значительной степени не имеют прямой причинно-следственной биологической связи с повреждением или ремоделированием лёгких. Тем не менее, ряд сывороточных биомаркеров могут предсказывать будущие результаты, связанные с ухудшением здоровья органов дыхания и риском развития ХОБЛ. К ним относятся плазменный фибриноген и С-реактивный белок, противовоспалительный

белок СС16, молекула ICAM-1 (межклеточная адгезионная молекула 1), сывороточная ММР-7 (матриксная металлопротеиназа 7) и др. [32].

Чёткое определение нарушения здоровья органов дыхания, открытие и проверка биомаркеров для его обнаружения позволят улучшить скрининг населения и проводить более целенаправленные вмешательства, которые могут смягчить переход от «идеального» к нарушенному здоровью дыхательной системы (и позднее к заболеванию) или могут даже способствовать переходу обратно к «идеальному» здоровью органов дыхания.

Нами проведено исследование факторов, предположительно влияющих на риск развития ХОБЛ у обследуемых респондентов без обструктивной патологии. В таблице 3 приведены параметры логистической регрессии для факторов, имеющих максимальную статистическую значимость влияния на вероятность риска развития ХОБЛ.

Среди количественных факторов значимую связь с вероятностью риска развития ХОБЛ показали опросник для диагностики ХОБЛ, баллы ($p < 0,0001$), ИК ($p < 0,0001$), ОФВ1/ФЖЕЛ, % ($p < 0,0001$), ОФВ1/ФЖЕЛ, постБД% ($p < 0,0001$), ОФВ1, % ($p < 0,0001$), ОФВ1, постБД% ($p < 0,0001$), разница значений ИЛ-8 до/после ОБФПТ с РСД ($p = 0,02$), качественных – пол ($p < 0,0001$).

В ходе проведения анализа логистической регрессии разницы значений иммунологических показателей ротовой жидкости ИЛ-13, НЭ, МПО, лактоферрина, лизоцима, лейкотриена В4 исходно и после ОБФПТ с РСД не показали себя значимыми прогностическими маркерами вероятности риска развития ХОБЛ, уровень статистической значимости $p > 0,05$. Уровень статистической значимости $p < 0,05$ был получен для разницы значений ИЛ-8 в РЖ до и после ОБФПТ с РСД ($p = 0,02$). Таким образом, в модель прогнозирования вероятности риска развития ХОБЛ был включён ИЛ-8.

При анализе иммунологических показателей ротовой жидкости (ИЛ-8, ИЛ-13, НЭ, МПО, лактоферрин, лизоцим, лейкотриен В4) достоверных различий в исходном уровне между группами пациентов по уровню ИЛ-8, ИЛ-13 между курящими лицами, а также в исходных значениях НЭ между всеми обследуемыми выявлено не было.

В результате выбора лучшей комбинации предикторов с наивысшим предсказательным потенциалом, оптимальными значениями чувствительности и специфичности в модель бинарной логистической регрессии были внесены переменные: ИК, результаты опросника для диагностики ХОБЛ, ОФВ1/ФЖЕЛпостБД, разница значений уровня ИЛ-8 до и после ОБФПТ (табл. 4).

Таблица 3. Прогностическая значимость факторов риска развития ХОБЛ

Предиктор	ОШ	95 % ДИ ОШ	Статистическая значимость различий
Индекс курения (пачка-лет)	0,1	0,04-0,3	<0,0001
Опросник для диагностики ХОБЛ (CDQ), баллы	0,83	14,5-17,5	<0,0001
Пол (мужчина/женщина)	0,03	0,008-0,1	<0,0001
ОФВ1/ФЖЕЛ, %	0,82	0,75-0,90	<0,0001
ОФВ1/ФЖЕЛ, постБД%	0,77	0,68-0,88	<0,0001
ОФВ1, %	0,93	0,90-0,96	<0,0001
ОФВ1, постБД%	0,91	0,86-0,95	<0,0001
Разница значений уровня ИЛ-8 до/после орально-буккально-фарингеального полоскательного теста с раствором сигаретного дыма	1,01	1,00-1,02	0,02

Таблица 4. Переменные в уравнении прогностической модели

Показатель	Коэффициент регрессии (В)	Ехр коэффициента регрессии (В) (95 % ДИ)	Достигнутый уровень значимости
Индекс курения (пачка-лет)	2,05	1,2(1,1-1,3)	$p < 0,0001$
Опросник для диагностики ХОБЛ (CDQ), баллы	2,01	8,3 (6,3-24,7)	$p < 0,0001$
ОФВ1/ФЖЕЛпостБД, %	-0,3	0,8 (0,7-0,9)	0,001
Разница значений уровня ИЛ-8 до и после орально-буккально-фарингеального полоскательного теста	0,01	1,01(1,0-1,2)	0,03
Константа	-2,3	0,001	$p = 0,005$

Коэффициенты предикторов были статистически значимы ($p < 0,05$), поэтому все предикторы были включены в модель.

В процессе анализа рассчитано регрессионное уравнение для оценки вероятности риска развития ХОБЛ.

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 \times x_1 + b_2 \times x_2 + b_3 \times x_3 + b_4 \times x_4)}}$$

где: p – интегрированный результат регрессионного вычисления комбинации значений определяемых показателей; коэффициенты регрессионного уравнения: $b_1=2,05$, $b_2=2,01$, $b_3=-0,3$, $b_4=0,01$, b_0 – свободный член данного уравнения, $b_0=-2,3$; численные значения предикторов: X_1 – индекс курения (ИК) (пачка-лет), X_2 – результаты опросника для диагностики ХОБЛ, X_3 – ОФВ1/ФЖЕЛпостБД (в %), X_4 – разница значений уровня ИЛ-8 до и после ОБФПТ,%, e – основание натурального логарифма. Разработанная прогностическая модель имеет следующие характеристики: $R^2=0,813$.

В ходе анализа выявлено, что комплекс факторов, включающий параметры: результаты опросника для диагностики ХОБЛ, ИК, ОФВ1/ФЖЕЛпостБД, разница значений уровня ИЛ-8 до и после ОБФПТ позволяет оценивать вероятность риска развития нейтрофильного воспалительного эндотипа ХОБЛ у курящих лиц без обструктивной патологии. На основании данных анализа ROC-кривой определён оптимальный порог отсечения при оптимальных чувствительности 90% и специфичности 70%, который составил 3,5 (рис. 3).

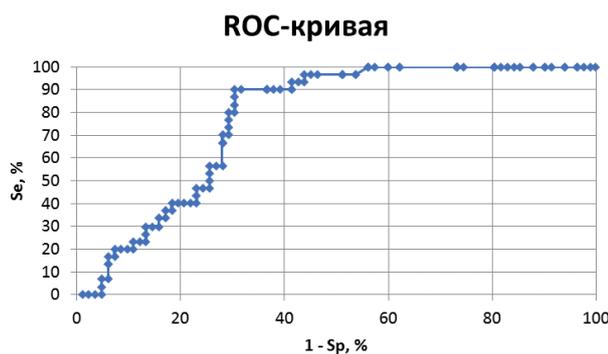


Рис. 3. ROC-анализ качества разработанной прогностической модели

Таким образом, значение $< 3,5$ оценивает низкую вероятность риска развития нейтрофильного воспалительного эндотипа ХОБЛ у курящих лиц без обструктивной патологии, значение $\geq 3,5$ свидетельствует о высокой вероятности риска развития нейтрофильного воспалительного эндотипа ХОБЛ.

Выводы

1. Установлены различия в уровнях биомаркеров нейтрофильного и T2 воспаления в ротовой жидкости пациентов с ХОБЛ в сравнении с лицами без обструктивных заболеваний лёгких, а именно: повышение уровней лизоцима, лактоферрина, ИЛ-13, и снижение уровня миелопероксидазы.
2. Обнаружены особенности иммунологического ответа на орально-буккально-фарингеальное воздействие раствором сигаретного дыма у пациентов с ХОБЛ в сравнении с лицами без обструктивных заболеваний лёгких. После провокации у пациентов с ХОБЛ выявлен повышенный уровень нейтрофильной эластазы среди некурящих лиц по сравнению с курильщиками, а также между некурящими пациентами с ХОБЛ и некурящими лицами из группы сравнения, уровень ИЛ-8 также был достоверно выше у пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми респондентами без обструктивной патологии, увеличение уровня миелопероксидазы в подгруппе некурящих пациентов с ХОБЛ.
3. В результате проведённого исследования установлены наиболее значимые факторы, ассоциированные с вероятностью риска развития ХОБЛ: индекс курения, результаты стандартизированного опросника для диагностики ХОБЛ (COPD diagnostic questionnaire (CDQ)), ОФВ1, %, ОФВ1, постБД%, ОФВ1/ФЖЕЛ, %, ОФВ1/ФЖЕЛ, постБД%, пол, разница значений ИЛ-8 до/после ОБФПТ с раствором сигаретного дыма. На основе полученных данных разработана математическая модель, позволяющая прогнозировать вероятность риска развития нейтрофильного воспалительного эндотипа ХОБЛ у лиц без обструктивной патологии лёгких.

Таким образом, разработан комплексный метод прогнозирования риска развития ХОБЛ на основе использования доступных анамнестических, а также клинико-диагностических и иммунологических данных, результаты которых дают возможность имплементировать разработанную математическую модель в практическую деятельность в организациях здравоохранения, разработанная математическая модель рациональна, информативна, что позволит врачам общей практики, врачам-пульмонологам, врачам-аллергологам-иммунологам, врачам-профпатологам персонифицировать подходы в ранней диагностике и профилактике ХОБЛ.

Литература

1. Global strategy for prevention, diagnosis and management of COPD: 2024 Report [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://goldcopd.org/2024-gold-report/>. Дата доступа: 31.01.2024.
2. Murphy DE, Panos RJ. Diagnosis of COPD and clinical course in patients with unrecognized airflow limitation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2013;8:199-208. doi:10.2147/COPD.S39555. Epub 2013 Apr 18.
3. Клинический протокол диагностики и лечения хронической обструктивной болезни легких: приказ об утверждении некоторых клинических протоколов и признании утратившими силу отдельного структурного элемента приказа Министерства Здравоохранения Респ. Беларусь, 19 мая 2005 г., № 274.
4. Stanley AJ, Hasan I, Crockett AJ, et al. COPD Diagnostic Questionnaire (CDQ) for selecting at-risk patients for spirometry: a cross-sectional study in Australian general practice. *NPJ Prim Care Respir Med.* 2014 Jul 10;24:14024.
5. Ищенко О.В., Юпатова Т.Г. Влияние водного экстракта табака сигарет на уровень лизоцима и лактоферрина в ротовой жидкости. *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 2017;4:37-43.
6. Устройство для получения водного раствора сигаретного дыма: МПК А 24F 47/00 (2006.01) / Новиков Д.К., Ищенко О.В., Юпатова Т.Г., Кондерский Н.М., Щурок И.Н. : заявитель : Учреждение образования "Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет". – № и 20180169 ; заявл. 14.06.2018 ; опубл. 10.09.2018 / Нац. центр интел. собственности.
7. Ghebre MA, Bafadhel M, Desai D, et al. Biological clustering supports both "Dutch" and "British" hypotheses of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(1):63-72.
8. Ferraboschi P, Ciceri S, Grisenti P. Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. *Antibiotics.* 2021;10:1534.
9. Ищенко О.В., Юпатова Т.Г. Влияние водного экстракта табака сигарет на уровень лизоцима и лактоферрина в ротовой жидкости. *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 2017;4:37-43.
10. Jiang L, Li Y, Wang L, et al. Recent Insights Into the Prognostic and Therapeutic Applications of Lysozymes. *Front Pharmacol.* 2021 Dec 3;12:767642.
11. Fukuchi Y, Tatsumi K, Inoue H, et al. Prevention of COPD exacerbation by lysozyme: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016 Apr 21;11:831-838.
12. Ward PP, Paz E, Conneely OM. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Nov;62(22):2540-2548.
13. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica.* 1995;80:252-267.
14. Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM. Lactoferrin and host defense. *Biochem. Cell Biol.* 2002;80:95-102.
15. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol.* 2002;80:1-6.
16. Kaczyńska K, Jampolska M, Wojciechowski P, et al. Potential of Lactoferrin in the Treatment of Lung Diseases. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023 Jan 28;16(2):192.
17. Caccavo D, Pellegrino NM, Altamura M, et al. Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *J. Endotoxin. Res.* 2002;8:403-417.
18. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals.* 2004;17:189-196.
19. van Hooijdonk AC, Kussendrager KD, Steijns JM. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br. J. Nutr.* 84 Suppl. 2000;1:S127-134.
20. Wechsler ME, Wells JM. What every clinician should know about inflammation in COPD. *ERJ Open Res.* 2024 Sep 23;10(5):00177-2024.
21. Barnes PJ, Baker J, Donnelly LE. Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019 Sep 1;200(5):556-564.
22. Henrot P, Prevel R, Berger P, et al. Chemokines in COPD: From Implication to Therapeutic Use. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 6;20(11):2785.
23. Saha S, Mistry V, Siva R, et al. Induced sputum and bronchial mucosal expression of interleukin-13 is not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Allergy.* 2008 Sep;63(9):1239-1243.
24. Barcelo B, Pons J, Fuster A, et al. Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol.* 2006;145:474-479.
25. Doyle AD, Mukherjee M, LeSuer WE, et al. Eosinophil-derived IL-13 promotes emphysema. *Eur Respir J.* 2019 May 30;53(5):1801291.
26. Nauseef WM. Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2018;642:1-9.
27. Churg A, Marshall CV, Sin DD, et al. Late intervention with a myeloperoxidase inhibitor stops progression of experimental chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(1):34-43.
28. Bardeel BW, Kenny EF, Sollberger G, et al. The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe.* 2014 May 14;15(5):526-536.
29. Christie PE, Barnes NC. Leukotriene B4 and asthma. *Thorax.* 1996 Dec;51(12):1171-1173.
30. Upadhyay P, Wu CW, Pham A, et al. Animal models and mechanisms of tobacco smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2023 Jul 4;26(5):275-305.
31. Zhang W, Lin H, Zou M, et al. Nicotine in Inflammatory Diseases: Anti-Inflammatory and Pro-Inflammatory Effects. *Front Immunol.* 2022 Feb 18;13:826889.
32. Stolz D, Mkorombindo T, Schumann DM, et al. Towards the elimination of chronic obstructive pulmonary disease: a Lancet Commission. *Lancet.* 2022 Sep 17;400(10356):921-972.

Сведения об авторах

Гордиевич Татьяна Геннадьевна – ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный медицинский университет», 210009 г. Витебск, пр. Фрунзе, 27. E-mail: tatyana.gordievich@gmail.com.

Ищенко Оксана Владимировна – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный медицинский университет», 210009 г. Витебск, пр. Фрунзе, 27.

Поступила 30.08.2024.

Статья принимает участие в Ермольевском конкурсе научных публикаций