

Гиперчувствительность нейтрофилов при обструктивных заболеваниях легких

О.В. Ищенко¹, А.В. Сукало²

¹ Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь

Neutrophil hypersensitivity in chronic obstructive pulmonary disease

A.U. Ishchanka¹, A.V. Sukalo²

¹ Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Аннотация

Цель работы – изучение гиперчувствительности нейтрофилов при хронических обструктивных заболеваниях легких путем определения выделения миелопероксидазы (МПО) из нейтрофилов.

Материал и методы. В исследование включали больных с хронической обструктивной болезнью легких средней степени тяжести (критерии GOLD, n=37(из них курильщиков 22); 49(42;64) лет), пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы (критерии GINA, n=42 (из них курильщиков 12); 47 (39;56) лет). Кровь для исследования у больных забирали из вены утром натощак на вторые сутки поступления в стационар. Контрольная группа состояла из здоровых доноров без респираторной патологии (n=26 (из них курильщики 8); 44 (35;57) лет). Использовали реакцию выброса миелопероксидазы из лейкоцитов крови после их инкубации с растворами токсикантов (сигаретный дым, экстракт табака сигарет, выхлопные газы двигателей внутреннего сгорания).

Результаты. После инкубации лейкоцитов крови больных хроническими обструктивными заболеваниями с растворами токсикантов происходит дегрануляция нейтрофилов с выбросом МПО. В группе больных с аллергической БА (n=42) реакция была положительна у 30 больных с водным экстрактом табака, у 31 больного с раствором сигаретного дыма, у 27 больных с раствором выхлопных газов. В группе ХОБЛ (n=37) реакция была положительна у 21 больного с водным экстрактом табака, у 31 больного с раствором сигаретного дыма, у 24 больных с раствором выхлопных газов. У курильщиков с ХОБЛ выброс МПО был ниже, чем у некурящих. В контрольной группе (n=26) положительная реакция наблюдалась реже: у 2 доноров с водным экстрактом табака, у 9 доноров с раствором сигаретного дыма, у 10 доноров с раствором выхлопных газов.

Вывод. Впервые разработаны и апробированы диа-

Summary

Objective. Aim was the development and testing of a method of diagnostics of hypersensitivity to toxicants in chronic obstructive pulmonary disease by evaluating the myeloperoxidase release from neutrophils.

Material and methods. The patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n = 37 (22 smokers); age 49 (42; 64)) and patients with allergic bronchial asthma (n = 42 (12 smokers); age 47 (39; 56)) were included in the study. The control group consisted of healthy donors without respiratory pathology (n = 26 (8 smokers), age 44 (35; 57)). We used the reaction of myeloperoxidase (MPO) release with solutions toxicants (cigarette smoke, exhaust gases) for diagnostic.

Results. The MPO release from neutrophils occurred during the incubation of leukocytes of patients with solutions toxicants. In patients with asthma, the reaction was positive in 30 patients with an extract of tobacco, 31 patients with a cigarette smoke solution, 27 patients with a solution of the exhaust gases. In patients with COPD, the reaction was positive in 21 patients with an extract of tobacco, 31 patients with a cigarette smoke solution, 24 patients with a solution of the exhaust gases. MPO release was lower to smokers with COPD than non smokers-COPD patients. In the control group, the reaction was positive in 2 donors with an extract of tobacco, 9 - with cigarette smoke solution, and 10 - with a solution of the exhaust gases.

Conclusion. The diagnostic tests to evaluate neutrophil hypersensitivity to toxicants in COPD and asthma were developed and approved. Proposed method allows determining the sensitization of leukocytes to the toxicant, which may be one of the diagnostic criteria for these diseases.

гностические тесты для оценки гиперчувствительности нейтрофилов к токсикантам при ХОБЛ и БА. У больных ХОБЛ и БА предложенный метод позволяет определить повышенную чувствительность лейкоцитов к токсикантам, что может быть одним из диагностических критериев этих заболеваний.

Ключевые слова

Гиперчувствительность, хроническая обструктивная болезнь легких, бронхиальная астма, миелопероксидаза, токсикант

Гиперчувствительность – это ответная реакция организма с клиническими симптомами на низкие дозы любых веществ и физических факторов, которые не вызывают такой реакции у подавляющего большинства ($\approx 85\%$ и более) здоровых людей [1]. Гиперреактивность – повышенная ответная реакция организма с клиническими симптомами или признаками на любые дозы патогена, которые не вызывают такой реакции у большинства людей.

Гиперчувствительность зависит от количества и аффинности рецепторов клеток, связывающих конкретное вещество или активности структур, воспринимающих энергетические, волновые, тепловые, холодовые сигналы. Гиперреактивность как совокупный ответ организма зависит не только от исходных клеток, реагирующих на раздражитель-патоген, но и от других клеток, вовлекаемых в ответную реакцию, которую они могут усиливать или уменьшать. Аллергия – совокупная реакция организма базируется на специфической гиперчувствительности и гиперреактивности. Гиперчувствительность при ней первична и обеспечивается антителами и рецепторами иммунных Т- и В-лимфоцитов, связывающими аллергены, запускающими дальнейшее развитие иммунной реакции, основанной на вовлечении в ответ других клеток, что и приводит в итоге к развитию гиперреактивности как конечной фазы аллергии [1].

Механизмы неспецифической гиперчувствительности (НГ) неясны. По-видимому, как и специфическая, аллергическая, она бывает двух типов – немедленная и замедленная и в ней участвуют системы врожденного иммунитета и лимфоциты. Примером первой может служить неиммунная активация комплемента через альтернативный или лектиновый путь с появлением анафилактинов и клиникой анафилаксии (шока). К ней же можно отнести дегрануляцию базофилов, эозинофилов и нейтрофилов под влиянием не-

Keywords

Hypersensitivity, chronic obstructive pulmonary disease, bronchial asthma, myeloperoxidase, toxicant

специфических агентов и физических факторов (холод, тепло, вибрация, солнечные лучи, физическая нагрузка); клинически – это синдромы крапивницы, астмы и другие. Замедленный тип НГ обусловлен активацией Т- и В-лимфоцитов и, возможно, моноцитов- макрофагов, эпителия и дендритных клеток. Причем эта активация различными агентами и факторами осуществляется через систему PAMP (Toll и др.) мембранных или внутриклеточных рецепторов [1, 2]. Пути активации различны и предложено ряд гипотез на примере НГ к лекарствам: накопление «реактивных» метаболитов, «сигналы опасности» для антигенпредставляющих клеток, «p-i»-гипотеза непосредственной стимуляции препаратом Т-клеток не через антигенспецифический рецептор, а подобно суперантигену через β -цепь [2]. Хотя и на лекарства нередко наблюдаются обычные иммунные аллергические реакции. Для диагностики каждого типа или варианта немедленной или замедленной НГ используются специальные методы определения продуктов активации комплемента, маркеров активации клеток, их медиаторов и цитокинов, которые применяются и как тесты выявления иммунной реакции.

Все клетки могут участвовать в реакциях гиперчувствительности, одни из них являются аллергенспецифическими и могут опосредоваться через связанный их Fc ϵ R-рецептором IgE, или IgG-антитела Fc γ -рецептором, другие – неспецифические, обусловлены активацией через иные (PAMP и др.) рецепторы. Так, используя тест стимуляции экспрессии CD69 молекул на Т-лимфоцитах, возможно, выявлять реакции гиперчувствительности к лекарствам [3, 4].

Разработана реакция выброса миелопероксидазы (РВМ) для диагностики нейтрофильной гиперчувствительности [5]. Эта реакция была использована для выявления IgE и IgG зависимых реакций гранулоцитов на синтетические красители (кармуазин, сансет желтый, тартра-

зин) у больных аллергическими заболеваниями [5, 6, 7].

Миелопероксидаза играет важную роль в развитии обструктивных заболеваний [8]. МПО наряду с IL-8 и лейкотриеном В4 используют в качестве маркеров активации нейтрофилов. Мета-анализ статей [9] посвященных МПО при ХОБЛ показал высокий уровень МПО в мокроте у больных ХОБЛ по сравнению с контрольной группой, особенно во время обострения. Кроме того терапия теофиллином уменьшала нейтрофильное воспаление, которое сопровождалось снижением МПО мокроты. МПО может быть потенциально полезным не инвазивным биомаркером оценки воспаления дыхательных путей.

Хронический воспалительный процесс при обструктивных заболеваниях легких развивается у генетически детерминированных лиц при воздействии аллергенов или токсикантов [10, 11, 12, 13]. Длительное или массивное воздействие приводит гиперактивации системы иммунитета и реализации неконтролируемого воспалительного ответа. Диагностические тесты при нейтрофильном воспалении индуцированном токсикантами не разработаны. Нет методов определения гиперчувствительности к табаку, газам двигателей внутреннего сгорания и другим токсикантам.

Мы обнаружили, что при инкубации лейкоцитов больных хроническими обструктивными заболеваниями с модельными растворами токсикантов (сигаретный дым, газы двигателей внутреннего сгорания и др.) происходит дегрануляция нейтрофилов с выбросом миелопероксидазы, активность, которой можно определить фотометрически в надосадочной жидкости.

Материалы и методы

В исследование включали пациентов с ХОБЛ средней и тяжелой степени тяжести (n=37), пациентов с аллергической формой БА средней степени тяжести (n=42). Группа сравнения состояла из здоровых добровольцев без респираторной патологии (n=26). Для однородности групп по возрасту в исследование включали участников старше 35 лет. Все участники исследования дали и собственноручно заполнили добровольное информированное согласие. Демографическая и клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Группы были однородны по возрасту, продолжительности заболевания, количеству обострений. Они различались по полу, статусу курения и индексу массы тела. В группе пациентов с ХОБЛ преобладали мужчины с высоким статусом курения, что соответствует общемировой статистике.

Сенсибилизацию к бытовым и пыльцевым аллергенам оценивали провокационными внутрикожными (с коммерческими водно-солевыми экстрактами бытовых и эпидермальных аллергенов) и скарификационными (с коммерческими водно-солевыми экстрактами пыльцевых аллергенов) тестами.

Двадцати двум пациентам с ХОБЛ и двум с БА не проведено тестирование в связи с наличием противопоказаний: хроническое легочное сердце с явлениями недостаточности, выраженная эмфизема легких, пневмосклероз, артериальная гипертензия II-III стадии, сахарный диабет 2 типа субкомпенсация.

В реакции использовали приготовленные модельные растворы, имитирующие действие ток-

Таблица 1. Клиническая и демографическая характеристика пациентов в исследовании гиперчувствительности нейтрофилов к токсикантам (Ме(25%;75%))

Показатели	ХОБЛ n=37	БА n=42	Группа сравнения n=26
Возраст, г.	49 (42;64)	47 (39;56)	44 (35;57)
Пол, м/ж	23/14*	15/27	8/18
Длительность заболевания, г.	14(5;19)	15 (4;25)	0
Индекс курения, пачка-лет (пачка-день x стаж курения в годах)	21 (8;39)*	13 (0;25)	8 (0;14)*
Статус курения, да/нет	22/15*	12/30	8/18
Сенсибилизация к бытовым, эпидермальным и/или пыльцевым (да/нет/не определяли)	2/13/22*	38/2/2*	5/21/0*
Число обострений за последний год	3 (2;4)	3 (2;3)	0
Индекс массы тела, кг/м ²	24,3±3,5*	28±4,5	26,3±3,7

Примечание - * p<0,05.

сикантов (экстракт табака сигарет, сигаретный дым, выхлопные газы двигателей внутреннего сгорания).

Приготовление экстракта табака сигарет проводили по методике Т. М. Petro с соавторами [14] с небольшими изменениями. Для приготовления экстракта табака использовали табак одной сигареты 0,87 г марки «Kent №8» (British-American Tobacco Holding, Великобритания) с содержанием никотина 9,8 мг [15]. Табак сигареты заливали 10,0 мл физиологического раствора хлорида натрия в фосфатном буфере, настаивали 24 часа при комнатной температуре. Смесь центрифугировали 10 мин при центробежном ускорении $450 \times g$. Супернатант собирали и повторно центрифугировали 1 час при $7000 \times g$. Затем суспензию стерилизовали фильтрованием последовательно через бумажные и стеклянные стерильные фильтры диаметром 0,2 мкм. рН раствора доводили до 7,4. Концентрация фильтрованного раствора принимали за 100%. Концентрацию никотина в приготовленном таким образом экстракте определяли на жидкостном хроматографе «Миллихром-5-3», используя аналитический стандарт никотина (100 мкг/мл, Pestanal, Германия). Концентрация никотина составила $1,17 \pm 0,06$ мг/мл. Непосредственно перед постановкой реакции маточный раствор разводили стерильным физиологическим фосфатным буферным раствором 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000. Оптимальное разведение раствора было принято 1:100. Растворы других концентраций давали ложно положительные результаты в контрольной группе (1:10) или ложно отрицательные тесты (1:1000; 1:10000).

Для приготовления раствора сигаретного дыма использовали методику S. Hodge с соавторами [16] с небольшими изменениями. В стеклянную колбу (поглотитель дыма) наливали 10 мл физиологического фосфатного буфера. Через трубку выдыхали вакуумом под давлением сигаретный дым при выкуривании одной сигареты марки «Kent №8» (British-American Tobacco Holding, Великобритания) с содержанием в дыме одной сигареты смолы 8 мг, никотина 0,6 мг. Сигарету выкуривали до 80% в течение 5 мин. Сигаретный дым проходил через раствор с бурлением. В результате в растворе находились растворимые фракции сигаретного дыма. Раствор стерилизовали фильтрованием через стеклянные стерильные фильтры диаметром 0,2 мкм. рН раствора был равен 7,4-7,5. Раствор готовили не позднее 30 мин до исследования. Полученный раствор принимали за 100%. Поскольку нет стандартизированного способа оценки состава

раствора сигаретного дыма, концентрация раствора сигаретного дыма рассчитывалась в произвольных единицах как эквивалент сигареты на миллилитр раствора 100% раствор = 1 ед/мл [17]. Для постановки проб готовый раствор разводили стерильным фосфатным буферным раствором для получения оптимальной рабочей концентрации 1:100 (0,01 ед/мл). Эта концентрация приблизительно эквивалентна курению 1 сигареты [18].

Для приготовления раствора выхлопных газов двигателей внутреннего сгорания использовали метод, предложенный К. С. Голохвастом с соавторами [19]. Двигатель дизельного легкового автомобиля среднего класса (по классификации ОН 02527066), экологического класса Евро-3 [20] заводили. Он работал в течение 2-3 мин для удаления из выхлопной трубы всех посторонних частиц пыли и сажи. Затем двигатель глушили и к выхлопной трубе автомобиля подсоединяли поливиниловые гибкие трубки, концы которых опускали на дно стерильного стеклянного флакона содержащего 500 мл физиологического фосфатного буферного раствора. Далее автомобиль заводили, и его двигатель работал на нейтральной скорости в течение 5 минут. За это время через раствор проходило около 1000 л выхлопных газов $1/3$ из выброшенных за 5 мин (700 л/мин $\times 5 = 3500$ л). Полученную суспензию дважды фильтровали через бумажные фильтры, а затем стеклянные. рН раствора доводили до 7,4. В полученном растворе проводили измерение массовой концентрации нефтепродуктов флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02» М 01-05-2012 (методика ПНД Ф 14.1:2.4.128-98). Средняя концентрация растворенных нефтепродуктов в суспензии составила $3,47 \pm 0,5$ мг/л. Непосредственно перед постановкой теста полученный раствор разводили 1:100 фосфатным буферным раствором. Концентрация раствора выхлопных газов была оптимизирована титрованием с лейкоцитами доноров так, что токсикант не вызывал выброс МПО более чем в 60% проб.

Для исследования периферическую венозную кровь 10 мл у пациентов забирали в пробирку с гепарином (20 ед/мл) утром натощак не ранее, чем через 2 суток после окончания инфузионной терапии глюкокортикостероидами.

Ход реакции.

После отстаивания крови, удаляли плазму с лейкоцитами, центрифугировали при 1500 об/мин, надосадочную жидкость удаляли, осадок лейкоцитов разводили забеференным физиологическим раствором до консистенции 2 млн/мл. В

лунки иммунологического планшета вносили по 0,1мл (100 мкл) модельных растворов имитирующих действие токсикантов. Добавляли равный объем лейкосуспензии. Пробу дублировали. Параллельно ставили холостые пробы лейкосуспензии каждого пациента со стерильным физиологическим раствором хлорида натрия (отрицательный контроль). Смесь инкубировали 45 мин при 37°C. Центрифугировали на планшетной центрифуге в течение 10 мин при 1500 об/мин. Из каждой лунки планшета осторожно (чтобы не поднять клетки) забирали 50 мкл надосадочной жидкости и переносили в лунку планшета (под тем же номером) для ИФА. Вносили 100 мкл проявляющего раствора – хромоген-субстратной смеси (0,015% перекись водорода и тетраметилбензидин, разведенные фосфат-цитратным буфером). Инкубировали при комнатной температуре в течение 15-25 мин до появления выраженного окрашивания синего цвета. Реакцию останавливали внесением 50 мкл 4% серной кислоты, цвет раствора изменялся на желтый. Оценку реакции проводили на иммуноферментном анализаторе Ф-300 «Витязь» (Республика Беларусь), предназначенного для выполнения иммуноферментного анализа в планшетном формате (спектральный диапазон 340–620 нм) при длине волны 450 нм.

Для интерпретации результатов теста использовали ROC кривую (Receiver Operating Characteristic Curve) для расчета оптимального порога отсечения (optimal cut-off value).

Гиперчувствительность к компонентам сигарет, сигаретному дыму и выхлопным газам двигателей внутреннего сгорания

По результатам эксперимента рассчитали оптимальный порог процента прироста активности

миелопероксидазы при оптимальных чувствительности Se≈ специфичности Sp.

Для тестов с использованием с экстрактом табака из сигареты оптимальный порог прироста, обеспечивающий Se 60% и Sp 100% равен 109% AUC 0,884 $p < 0,05$ (рис.1.).

Для тестов с использованием модельного раствора сигаретного дыма оптимальный порог прироста, обеспечивающий Se 76% и Sp 65% равен 6% AUC 0,722 $p < 0,05$ (рис. 2.).

Для тестов с использованием модельного раствора выхлопных газов оптимальный порог прироста, обеспечивающий Se 65% и Sp 69% равен 32% AUC=0,664 $p < 0,05$ (рис. 3.).

В группе пациентов с аллергической БА (n=42) реакция была положительна у 30 больных с водным экстрактом табака (71%), у 31 больного с раствором сигаретного дыма (74%), у 27 больных с раствором выхлопных газов (62%).

В группе ХОБЛ (n=37) реакция была положительна у 21 больного с водным экстрактом табака (57%), у 31 больного с раствором сигаретного дыма (84%), у 24 больных с раствором выхлопных газов (65%).

Статистических различий между группами по количеству положительных реакций не было: рБА-ХОБЛ=0,239 с водным экстрактом табака; рБА-ХОБЛ=0,411 с водным раствором сигаретного дыма, рБА-ХОБЛ=1,0 с раствором выхлопных газов.

В группе сравнения (n=26) реакция была положительна у 2 человек (8%) с водным экстрактом табака (рБА-контроль<0,001; рХОБЛ-контроль<0,001), у 9 (35%) – с раствором сигаретного дыма (рБА-контроль<0,001; рХОБЛ-контроль=0,001), у 10 (38%) - с раствором выхлопных газов (рБА-контроль=0,048; рХОБЛ-

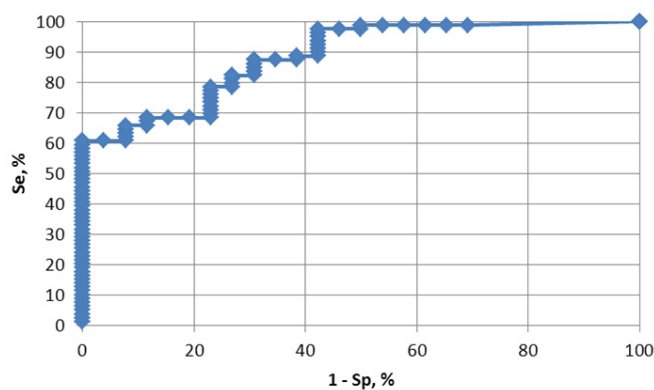


Рис. 1. ROC-кривая оценки результатов теста гиперреактивности нейтрофилов к экстракту из сигареты в диагностике обструктивных заболеваний

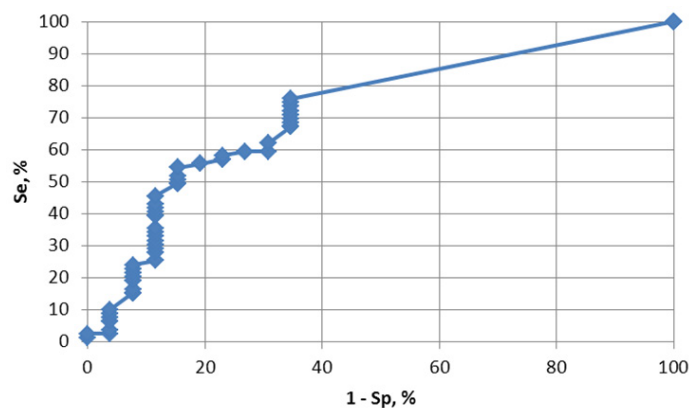


Рис. 2. ROC-кривая оценки результатов теста гиперреактивности нейтрофилов к раствору сигаретного дыма в диагностике обструктивных заболеваний

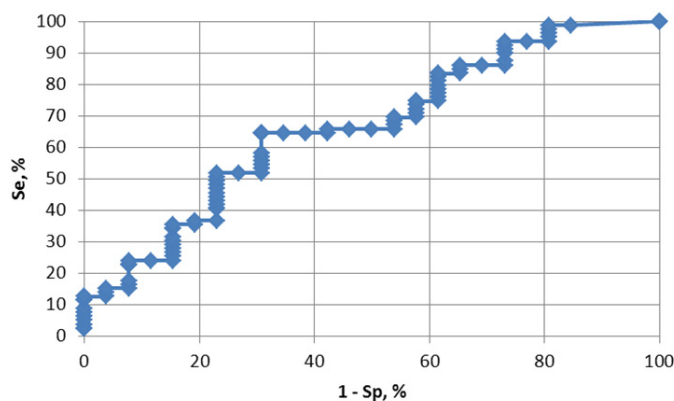


Рис. 3. ROC-кривая оценки результатов теста гиперреактивности нейтрофилов к раствору выхлопных газов в диагностике обструктивных заболеваний

контроль =0,045). Следовательно, у больных БА и ХОБЛ нейтрофилы чаще реагируют выбросом МПО на токсиканты, чем у доноров.

Прирост активности МПО (процент от контрольных величин) в надосадочной жидкости после инкубации лейкоцитов с токсикантами представлен в таблице 2.

Обнаружены достоверные различия в группах после инкубации лейкоцитов с водным экстрактом табака ($p = 0,001$). Максимальный прирост МПО обнаружен в группе пациентов с БА 155(72;236)% ($p_{\text{БА-контроль}} < 0,001$). В группе больных с ХОБЛ – 110(56;178)% ($p_{\text{ХОБЛ-контроль}} < 0,001$; $p_{\text{ХОБЛ-БА}} = 0,045$). У лиц без респираторной патологии наблюдали незначительный прирост МПО – 22(0;58)%.

Раствор сигаретного дыма практически не вызывал дегрануляции лейкоцитов и выброс МПО в группе сравнения 0(0;16)%. В группе па-

циентов с БА прирост активности МПО составил 12(2;34)% ($p_{\text{БА-контроль}} = 0,048$). В то время как у пациентов с ХОБЛ отмечалось повышение МПО на 34(13;55)% ($p_{\text{ХОБЛ-контроль}} < 0,001$; $p_{\text{ХОБЛ-БА}} = 0,002$).

После инкубации лейкоцитов с раствором выхлопных газов прирост МПО в группах больных обструктивными заболеваниями без статистических различий между группами составил при ХОБЛ 35(21;51)% и при БА 38(24;51)% ($p_{\text{БА-ХОБЛ}} = 0,513$), но превысил значения группы сравнения 30(5;37)% ($p_{\text{БА-контроль}} = 0,023$; $p_{\text{ХОБЛ-контроль}} = 0,046$).

Учитывая различия в группах по статусу курения, нами проанализированы результаты теста среди курильщиков (таб.3).

В группе больных с ХОБЛ у курильщиков выявлен меньший выброс МПО, чем у некурящих пациентов с ХОБЛ. Возможно, более низкие цифры прироста активности МПО связаны с

Таблица 2. Прирост активности миелопероксидазы в надосадочной жидкости после инкубации лейкоцитов с токсикантами (Ме(25%;75%))

Токсикант	ХОБЛ (n=37)	БА (n=42)	Группа сравнения (n=26)
Водный экстракт табака (1:100)	110(56;178)%*	155(72;236)%*	22(0;58)%*
Раствор сигаретного дыма (1:100)	34(13;55)%*	12(2;34)%	0(0;16)%
Раствор выхлопных газов (1:100)	35(21;51)%	38(24;51)%	30(5;37)%*

Примечание - * p<0,05 достоверные отличия между группами

Таблица 3. Прирост активности миелопероксидазы в надосадочной жидкости после инкубации лейкоцитов с токсикантами у курильщиков (Ме(25%;75%))

Токсикант	ХОБЛ (n=37)		БА (n=42)		Группа сравнения (n=26)	
	Курящие (n=22)	Не курящие (n=15)	Курящие (n=12)	Не курящие (n=30)	Курящие (n=8)	Не курящие (n=18)
Водный экстракт табака (1:100)	64 (34;106)%*	197 (142;233)%*	139 (53;172)%	174 (105;242)%	47 (25;80)%	39 (9;50)%
Раствор сигаретного дыма (1:100)	30 (12;55)%	45 (23;59)%	7 (0;22)%	14 (2;35)%	6 (0;20)%	0 (0;16)%
Раствор выхлопных газов (1:100)	32 (12;47)%	42 (32;56)%	41 (29;50)%	37 (24;51)%	30 (24;47)%	25 (2;35)%

Примечание - * p<0,001 достоверные отличия между группами ХОБЛ курильщики и ХОБЛ некурящие

адаптацией больных к токсикантам, гиперреактивность выражена слабее.

Диагностическая значимость тестов

Возможность использования предложенных тестов диагностики гиперчувствительности оценивали, рассчитывая показатели диагностической чувствительности Se, специфичности Sp и точности Ac (табл.4., табл.5.).

Положительные результаты теста с выявленной *in vivo* гиперчувствительностью к токсикантам считали истинно положительными TP (True Positives), а отрицательные – ложноотрицательными FN (False Negatives).

Отрицательные результаты у пациентов группы сравнения считали истинно отрицательными TN (True Negatives), а положительные – ложноположительными FP (False Positives).

Диагностическая чувствительность Se (31 позитивный тест из 37 в экспериментальной группе ХОБЛ) и точность Ac у больных ХОБЛ была более высокой 84% и 76% соответственно при

использовании в качестве токсиканта раствор сигаретного дыма.

В группе больных БА диагностическая чувствительность Se (31 позитивный тест из 42 в экспериментальной группе БА) была наиболее высокой 74% так же как и в группе ХОБЛ при использовании в качестве модельного токсиканта раствор сигаретного дыма. Что позволяет использовать реакцию выброса миелопероксидазы с модельным раствором сигаретного дыма в качестве скрининга для выявления больных с хроническими обструктивными заболеваниями.

Максимальную специфичность Sp 92% (2 ложно позитивных результата из 26 в группе сравнения) показал тест с водным экстрактом табака. Учитывая не высокую чувствительность метода Se 57% у больных с ХОБЛ и Se 71% у больных БА данный метод целесообразно использовать как тест второго уровня.

При инкубации лейкоцитов с раствором выхлопных газов получены средние уровни чувствительности Se (24 положительных результата

Таблица 4. Расчет диагностических коэффициентов для метода диагностики гиперчувствительности к токсикантам у больных с ХОБЛ

Токсикант					Se,(95% доверительный интервал)	Sp,(95% доверительный интервал)	Ac,(95% доверительный интервал)
	TP	FN	TN	FP			
Водный экстракт табака	21	16	24	2	57(46-61)%	92(77-99)%	71(59-77)%
Раствор сигаретного дыма	31	6	17	9	84(73-92)%	65(50-77)%	76(63-86)%
Раствор выхлопных газов	24	13	16	10	65(53-75)%	62(45-85)%	64(50-76)%

Примечание – отличия между результатами обследования опытной и группой сравнения $p < 0,05$ по всем токсикантам.

Таблица 5. Расчет диагностических коэффициентов для метода диагностики гиперчувствительности к токсикантам у больных с БА

Токсикант					Se,(95% доверительный интервал)	Sp,(95% доверительный интервал)	Ac,(95% доверительный интервал)
	TP	FN	TN	FP			
Водный экстракт табака	30	12	24	2	71(62-75)%	92(77-98)%	79(68-84)%
Раствор сигаретного дыма	31	11	17	9	74(63-82)%	65(49-79)%	70(58-81)%
Раствор выхлопных газов	27	15	16	10	64(54-74)%	62(45-77)%	63(50-75)%

Примечание – отличия между результатами обследования опытной и группой сравнения $p < 0,05$ по всем токсикантам.

из 37 в экспериментальной группе ХОБЛ; 27 положительных результата из 42 в экспериментальной группе БА), специфичности Sp (10 ложно положительных результата из 26 в контрольной группе) и точности Ac. Это связано с ежедневным контактом городского населения с выхлопными газами во вдыхаемом воздухе и развитием гиперчувствительности без клинических проявлений. Выявленные позитивные по этому показателю участники группы сравнения находятся в группе риска по развитию обструктивного заболевания.

Приводим описание клинического случая здорового волонтера контрольной группы, без респираторной патологии с максимальным значением прироста активности МПО с модельным раствором выхлопных газов двигателей внутреннего сгорания.

Доброволец Ц., женского пола, 42 года, ИМТ 28 кг/м².

17.06.2014 г. Жалоб не предъявляет.

Из перенесенных заболеваний отмечает острые респираторные заболевания, корь, краснуху в детском возрасте, однократно ангину. В 1998 году – острый бронхит. Тогда же отмечает эпизодическое курение – 1-2 сигареты в день

около 6 месяцев. В 2011 г. Перенесла внегоспитальную правостороннюю верхнедолевую пневмонию. Узловой зоб с 2006 г., принимает эутирокс 100 мкг в качестве заместительной терапии.

Аллергия на левомецетин с клиникой дерматита и но-шпу с клиникой крапивницы.

Среди родственников больных аллергическими заболеваниями нет. У отца курильщика – ХОБЛ. В контакте с веществами, раздражающими верхние дыхательные пути, не была. Живет в сухой квартире. Домашних животных нет. В настоящее время не курит.

При объективном осмотре состояние удовлетворительное. Повышенного питания. На коже и видимых слизистых патологических элементов нет. Дыхание через нос свободное. При перкуссии легких – ясный легочный звук. При аускультации везикулярное дыхание по всем полям. Частота дыхания 16 вдохов в минуту. Тоны сердца ритмичные, пульс 76 ударов в 1 минуту. Артериальное давление 120/80 мм рт.ст. Остальные органы без особенностей.

Проведены кожные тесты с аэроаллергенами. Кожные скарификационные тесты с пыльцевыми аллергенами отрицательны. Внутрикожные тесты

с бытовыми и эпидермальными аллергенами отрицательны.

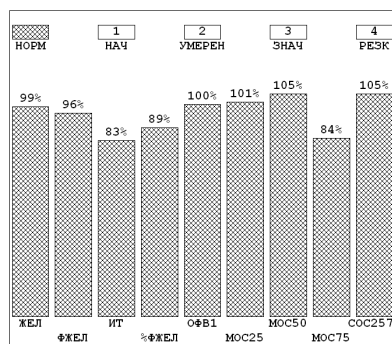
Рентгенография легких от 10.06.2014 г. Без патологии.

ЭКГ 17.06.2014 г. Ритм синусовый 82 в мин. Нормальное положение электрической оси сердца.

Компьютерная спирография 17.06.2014 г – FEV1 103% (3,10 л.), FEV1/FVC 91%. Бронхоконстрикторный тест с метахолином отрицателен – коэффициент бронхообструкции 9%.

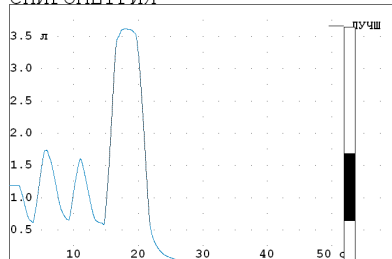
Прирост активности МПО после инкубации лейкоцитов с раствором выхлопных газов был равен 51%, что превышает пороговый уровень (32%) и средние значения в группах ХОБЛ и БА.

Через 4 месяца мы повторно пригласили волонтера Ц. для повторного обследования. Жалоб Ц. не предъявляла. За 4 прошедших месяца заболеваний верхних дыхательных путей и легких не отмечала. Данные спирографии приводим на рисунке 4. FEV1 равен 100%, но в абсолютных цифрах произошло снижение на 0,103 л., что



	НОРМ	ЛУЧШ	%
ЖЕЛ	л 3,69	3,64	99
ДО	л 0,55	1,04	188
МОД	л 6,55	5,31	81
РОВЫД	л 0,64		
РОВД	л 1,96		
ЧД	1/МИН 5		
ФЖЕЛ	л 3,56	3,41	96
ОФВ1	л 3,02	3,03	100
ОФВ1/ФЖЕЛ	% 89	83	
ИндТиф	% 82	83	
ПОСВЫД	л/с 6,67	6,19	93
ПОСВД	л/с 4,13		
МОС25	л/с 6,01	6,07	101
МОС50	л/с 4,41	4,64	105
МОС75	л/с 2,11	1,78	84
СОС2575	л/с 3,62	3,79	105
МВЛ	л/МИН 96		
ДОМ	л		
ЧДМ	1/МИН		
ПСДВ			

СПИРОМЕТРИЯ



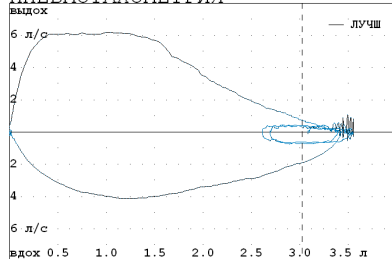
----- Критерий качества тестов -----

Нспиро	л	2	+
dЖЕЛ	л	0,02	+
Вокопч сп	л	0,00	+
Нпневмo		1	-
dОФВ1	л		
dФЖЕЛ	л		
Вэстр	л	0,09	+
Вокопч пн	л	0,16	+

+ критерий выполнен, - не выполнен

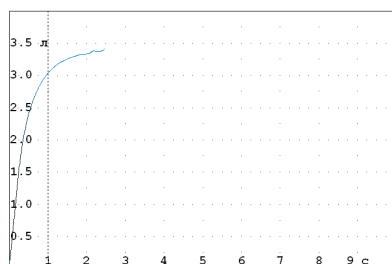
Заключение по ФВД:
вентиляционная функция легких не нарушена

ПНЕВМОТАХОМЕТРИЯ



17.06.2014->21.10.2014:
снижение ОФВ1 0,103 л

ВНИМАНИЕ!
Заключение является предварительным и требует подтверждения врача.



(подпись) / _____ (ФИО) /

Рис. 4. Функция внешнего дыхания у волонтера Ц. через 4 месяца после выявления гиперчувствительности к выхлопным газам

является неблагоприятной тенденцией. А в сочетании с выявленной гиперчувствительностью к выхлопным газам, перенесенным бронхитом, совпавшим с курением, и внегоспитальной пневмонией позволяет отнести волонтера Ц. к группе риска по развитию ХОБЛ.

Обсуждение результатов

В процессе исследования был впервые выявлен синдром гиперреактивности нейтрофилов больных ХОБЛ на токсиканты. Мы обнаружили, что при инкубации лейкоцитов больных хроническими обструктивными заболеваниями с модельными растворами токсикантов (сигаретный дым, газы двигателей внутреннего сгорания и др.) происходит дегрануляция нейтрофилов с выбросом миелопероксидазы, активность, которой можно определить фотометрически в надосадочной жидкости.

Этот феномен выявляет гиперчувствительность нейтрофилов к токсикантам при обструктивных заболеваниях. Опираясь на наши исследования, нами разработаны и апробированы диагностические тесты для оценки гиперчувствительности нейтрофилов к токсикантам при ХОБЛ и БА [21]. Предложенные методы позволяют определить повышенную чувствительность лейкоцитов к токсикантам больных ХОБЛ и БА, что может быть одним из диагностических критериев этих заболеваний.

Нами выявлены различия в чувствительности лейкоцитов к водным экстрактам сигарет у курящих и некурящих больных с ХОБЛ. У курильщиков с ХОБЛ выброс МПО ниже, чем у некурящих больных ХОБЛ. Вероятно, со временем вырабатывается толерантность к компонентам сигарет и гиперчувствительность нейтрофилов снижается.

Гиперчувствительность нейтрофилов к растворимым компонентам дыма сигарет была выше у пациентов с ХОБЛ по сравнению с больными БА, без различий в группах по показателю курения. Гиперчувствительность лейкоцитов к водорастворимым компонентам выхлопных газов внутреннего сгорания при ХОБЛ и БА была одинаковой.

Таким образом, *воспаление при ХОБЛ* можно определить как *реакцию гиперчувствительности* в генетически предрасположенном организме неспецифическую на начальном этапе (реакция врожденного иммунитета), но с включением

антигенспецифических механизмов адаптивного иммунитета на последующих этапах.

Выводы

1. Впервые разработаны и апробированы диагностические тесты для оценки гиперчувствительности нейтрофилов к токсикантам. У больных ХОБЛ и БА предложенные методы позволяют определить повышенную чувствительность лейкоцитов к токсикантам, что может быть одним из диагностических критериев этих заболеваний. Лейкоциты этих больных достоверно чаще и сильнее реагировали на токсиканты, чем лейкоциты доноров.
2. При инкубации лейкоцитов больных хроническими обструктивными заболеваниями с растворами токсикантов (экстракт табака, сигаретный дым, газы двигателей внутреннего сгорания) происходит дегрануляция нейтрофилов с выбросом МПО.
3. Установлено, что порогом для выявления гиперчувствительности к водному экстракту табака является прирост МПО более чем на 109%. В группе больных с аллергической БА прирост МПО был выше, чем у больных ХОБЛ.
4. У курящих и некурящих больных с ХОБЛ обнаружены различия в чувствительности лейкоцитов к водным экстрактам сигарет. У курильщиков с ХОБЛ выброс МПО был ниже, чем у некурящих больных ХОБЛ. Вероятно, со временем вырабатывалась толерантность к компонентам сигарет и гиперчувствительность нейтрофилов снижалась.
5. Прирост активности МПО после инкубации лейкоцитов с водным раствором сигарет не превышала 70%. Причем пороговый уровень прироста МПО равен 6%. Гиперчувствительность нейтрофилов к растворимым компонентам дыма сигарет была выше у пациентов с ХОБЛ по сравнению с больными БА, без различий в группах по показателю курения. У здоровых доноров такой гиперчувствительности не выявлено.
6. Гиперчувствительность лейкоцитов к водорастворимым компонентам выхлопных газов внутреннего сгорания при ХОБЛ и БА была одинаковой. Пороговое значение прироста МПО было 32%.

Литература

1. Новиков П.Д., Новиков Д.К., Титова Н.Д. Диагностика аллергии и гиперчувствительности: ведущее значение клеточных методов. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2016, №4:25-39
2. Elzagallaai A., Rieder M.J. In vitro testing for diagnosis of idiosyncratic adverse drug reactions: Implications for pathophysiology. *Br J Clin Pharmacol.* 2015; 80(4): 889-900.
3. Mayorga C, Sanz ML, Gamboa P, Garcia-Aviles MC, Fernandez J, Torres MJ. In Vitro Methods for Diagnosing Nonimmediate Hypersensitivity Reactions to Drugs. *Allergol Clin Immunol* 2013; Vol. 23(4): 213-225.
4. Elzagallaai A., Rieder M.J. In vitro testing for diagnosis of idiosyncratic adverse drug reactions: Implications for pathophysiology. *Br J Clin Pharmacol.* 2015; 80(4): 889-900.
5. Новиков П.Д., Новиков Д.К. Диагностика аллергии в реакции выброса миелопероксидазы под влиянием аллергена. *Иммунопатол., аллергол., инфектол.* 2002; 3: 63-69.
6. Титова Н.Д. Сенсibilизация гранулоцитов к пищевым красителям у больных с аллергическими заболеваниями. *Вестник Витебского государственного медицинского университета.* 2010; Т. 9. № 4: 117-122.
7. Титова Н.Д. Аллергические и неаллергические реакции на добавки к пище и лекарства. *Аллергология и иммунология.* 2010; Т. 11. № 3: 250-259.
8. Pulli B. et al. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *PLOS ONE.* 2013; Vol. 8, № 7: 967-976.
9. Zhu A. et al. Sputum myeloperoxidase in chronic obstructive pulmonary disease. *European Journal of Medical Research* 2014; № 1: 12-19.
10. Global atlas of asthma / EAACI executive committee; ed.: C. A. Akdis, I. Agache. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2013. XI, 179 p.
11. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, update 2017 (GINA) [Electronic resource]. GINAasthma.org. – Mode of access: <http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>. – Date of access: 28.03.2017.
12. Global strategy for the diagnosis management, and prevention of chronic obstructive lung disease, update 2017 (GOLD) [Electronic resource]. GOLD.org. – Mode of access: <http://goldcopd.org/gold-2017-global-strategy-diagnosis-management-prevention-copd/>. Date of access: 12.03.2017.
13. Global strategy for the diagnosis management, and prevention of chronic obstructive lung disease [Electronic resource]. GOLD.org. – Mode of access: <http://www.goldcopd.org>. – Date of access: 12.03.2009.
14. Petro T.M. et al. Smokeless tobacco extract decreases IL-12 production from LPS-stimulated but increases IL-12 from IFN- γ -stimulated macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2002; № 5: 345-355.
15. Никоноров В.В. Лифшиц Л.М., Киреева М.С. Определение никотина в табаке методом капиллярного электрофореза. *Вестник СПбГУ* 2014; Т. 1(59), № 2: 254-260.
16. Hodge S. et al. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocyte ability: implication in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2007; Vol. 37, № 6: 748-755.
17. Raveendran M., Senthil D., Utama B. et al. Effect of water-soluble fraction of cigarette smoke on human aortic endothelial cells – a proteomic approach. *Cell biology and toxicology.* 2005; 21(1): 27-40.
18. Hodge S. et al. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocyte ability: implication in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2007; Vol. 37, № 6: 748-755.
19. Голохваст К.С. и др. Экологическое значение гранулометрического метода исследования взвесей в выхлопном газе легковых автомобилей. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук* 2012; Т. 14, №1(9): 2405 – 2408.
20. Порватов И.Н., Кристальный С.Р. Классификация и маркировка автомобилей. Методические указания к практическим занятиям по дисциплине «Основы конструкции автомобилей». М.: МАДИ, 2010, 50 с.
21. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Карпук И.Ю. и др. Новые методы диагностики и иммунотерапии аллергии. *Аллергология и иммунология* 2015; Т. 16, №4: 335-339.

Сведения об авторах:

Ищенко О.В. - к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК ВГМУ. 210603 Витебск, пр. Фрунзе, 27. e-mail: all-vgmu@mail.ru.
Сукало Александр Васильевич - д.м.н., профессор, зав. 1-й кафедрой детских болезней БГМУ.

Поступила 17.11.2017 г.