

15. Палеев Н.Р., Растопина Н.А., Шуганов Е.Г. Существует ли пульмоногенная артериальная гипертензия? Тер. арх. 2002; 9: 78–81.

16. Incalzi A.R., Fuso L., De Rosa M. et al. Co-morbidity contributes to predict mortality of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Eur. Respir. J. 1997; 10: 2794–2800.

Поступила 18.11.03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 613.84–07:[616.155+616.24–008.8]–074

*Л.И.Волкова, Е.Б.Букреева, В.В.Боярко, Н.Г.Польща, Е.А.Дементьева,
С.В.Нестерович, О.Е.Акбашева*

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО И БИОХИМИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЫ И КРОВИ У КУРЯЩИХ И НЕКУРЯЩИХ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Сибирский государственный медицинский университет, кафедра внутренних болезней
педиатрического факультета, г. Томск

CHARACTERIZATION OF CELL AND BIOCHEMICAL PROFILE OF INDUCED SPUTUM AND BLOOD IN SMOKERS AND HEALTHY NONSMOKERS

*L.I.Volkova, E.B.Bukreyeva, V.V.Boyarko, N.G.Polscha, E.A.Dementieva,
S.V.Nesterovich, O.E.Akbasheva*

Summary

The aim of this study was to search cell structure of induced sputum (IS), activity of tripsin-like proteinase, elastase and their inhibitors: α_1 -proteinase inhibitor, α_2 -macroglobulin and acid-stable inhibitors in the IS and blood serum and of blood neutrophil activity in smokers and healthy nonsmokers.

We examined 67 healthy volunteers aged 19 to 42 yrs. The IS cytograms showed that the absolute amount of neutrophils and the percentage of lymphocytes were significantly higher and the percentage of macrophages was lower in smokers. They also had greater tripsin-like proteinase activity in serum and IS. The average cytochemical coefficient and the percentage of neutrophils with myeloperoxidase granules did not differ reliably in smokers and nonsmokers. There were quite strong positive correlations between smoking, neutrophils, lymphocytes, macrophages in IS and the tripsin-like activity in sputum and serum.

Резюме

Цель исследования — изучение клеточного состава индуцированной мокроты (ИМ), активности трипсиноподобных протеиназ, эластазы и их ингибиторов: α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина и кислотостабильных ингибиторов в ИМ и сыворотке крови, а также активности нейтрофилов периферической крови у некурящих и курящих здоровых.

Исследованы 67 здоровых волонтеров в возрасте от 19 до 42 лет. Исследование цитограмм ИМ показало, что у курильщиков достоверно больше абсолютное содержание нейтрофилов, процентное содержание лимфоцитов, меньше — процент макрофагов. У них же оказалась выше активность трипсиноподобных протеиназ как в сыворотке крови, так и в мокроте. Средний цитохимический коэффициент и процент нейтрофилов, содержащих гранулы миелопероксидазы, в группах курящих и некурящих достоверно не различались. Найдены достаточно высокие положительные корреляции между курением, нейтрофилами, лимфоцитами, макрофагами в ИМ и трипсиноподобной активностью как в мокроте, так и в сыворотке крови.

В настоящее время бронхиальную астму (БА) и хронический бронхит определяют по сути как хронические воспалительные заболевания бронхов. Изучение механизмов воспаления и контроль над ним, в частности для оптимизации лечения, предусматривает количественную оценку степени выраженности этого процесса. В связи с этим появление неинва-

зивного и воспроизводимого метода получения бронхиального содержимого методом индуцирования мокроты (ИМ) явилось существенным прогрессом [1–3]. Первые работы по исследованию ИМ для оценки воспаления при (БА) принадлежат *Pin I. et al.* [4]. За прошедшие годы было показано, что, по сравнению с другими неинвазивными методами получения

Таблица 1

Показатели клеточного состава индуцированной мокроты у здоровых людей (данные литературы)

Показатели	Jayaram L.	Lensmar C.		Holz	Hargreavae	Belda
		курящие	некурящие			
Цитоз, x 10 ⁶ /л	—	1,9	0,6		не более 0,55	
Макрофаги, %	60,8	59,2	41,2	66,0		58,8 ± 21,0
Нейтрофилы, %	36,7	34,0	52,2	25,2	< 36,0	37,2 ± 20,1
Эозинофилы, %	0,0	0,4	0,5		< 3,0	0,4 ± 0,9
Лимфоциты, %	0,5	0,9	2,0		< 2,0	1,0 ± 1,1

маркеров бронхиального воспаления, метод ИМ дает более взвешенные результаты, соответствующие степени воспаления.

Большое значение цитологических, цитохимических и молекулярных исследований ИМ подчеркивается Европейским респираторным обществом, которое поставило своей задачей стандартизацию метода и его дальнейшее усовершенствование [2].

Имеется еще много нерешенных вопросов, касающихся как самой методики индуцирования мокроты, так и оценки ее клеточного состава и других маркеров воспаления в ней. Интерпретация последних требует знания величин этих показателей у здоровых. Однако до настоящего времени не существует общепринятых норм цитологического и биохимического состава индуцированной мокроты (ИМ). Немногочисленные данные о клеточном составе ИМ у здоровых существенным образом различаются между собой, это же касается и сравнения цитограмм в зависимости от фактора курения (табл. 1). Пока нельзя говорить о наличии у здоровых общепринятых показателей ряда ферментов, свидетельствующих об активности клеток, участвующих в процессах воспаления, в частности нейтрофилов. В единичных работах на эту тему приводятся данные об активности протеиназ и их ингибиторов в бронхиальном секрете у здоровых [5]. Данных об активности миелопероксидазы (МПО), об уровнях активности протеиназ и МПО в мокроте у курящих и некурящих здоровых в доступной нам литературе не обнаружено.

Целью нашей работы явилось изучение клеточного состава ИМ, активности трипсиноподобных протеиназ, эластазы и их ингибиторов: α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина и кислотостабильных ингибиторов в ИМ и в сыворотке крови, а также активности нейтрофилов периферической крови у некурящих и курящих здоровых людей.

Материалы и методы

Обследованы 67 здоровых добровольцев в возрасте от 19 до 42 лет (45 — мужчины, 22 — женщины).

Условиями для включения в исследование были следующие факторы: отсутствие кашлевого анамнеза, бронхита, БА, патологических изменений при обзорной рентгенографии легких; нормальные показатели функции внешнего дыхания, по данным спирометрии, — ОФВ₁ не менее 80 % к должному; в течение последних 3 мес. добровольцы не болели ОРЗ. На выполнение всех процедур было получено согласие всех добровольцев.

Сбор ИМ осуществлялся после последовательно проводимых ингаляций 3-, 4-, 5-процентного раствора NaCl посредством ультразвукового небулайзера, с продолжительностью каждой из них 4–5 мин. До и после процедуры производилось измерение пиковой скорости выдоха (ПСВ). Мокрота исследовалась не позднее 2 ч после получения, ее обработка осуществлялась по стандартной методике [1]. Дифференцированный подсчет клеток проводился из 400 неэпителиальных клеток в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе. Для биохимических исследований производили забор венозной крови в объеме 3 мл. Подсчет нейтрофилов осуществлялся в мазках крови.

Трипсиноподобную активность протеиназы и активность эластазы в сыворотке крови и гомогенате мокроты определяли по скорости гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) и нитрофенилового эфира N-бутилоксикарбонил-L-аланина (БАНЭ) фирмы "Ренал" (Венгрия) [5]. Трипсиноподобную активность выражали в наномолях гидролизованного БАЭЭ, активность эластазы — в наномолях гидролизованного БАНЭ за 1 мин на 1 мл сыворотки крови или мокроты.

Активность α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ), α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) и кислотостабильных ингибиторов (КСИ) в сыворотке крови и гомогенате мокроты определяли по торможению гидролиза БАЭЭ трипсином и выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ) на 1 мл сыворотки или мокроты [5–7].

Активность нейтрофилов (НФ) оценивалась по степени их заполненности гранулами МПО, для чего в мазках крови подсчитывали процент НФ (+ — НФ с пылевидными гранулами МПО, ++ — НФ с равно-

Aventis Pharma



УДОБНЫЙ АНТИБИОТИК.

 **ТАВАНИК**
(левофлоксацин)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОДТВЕРЖДЕНА
У 350,000,000 ПАЦИЕНТОВ.

WWW.TAVANIC.RU

мерно заполненной гранулами МПО цитоплазмой, +++ — НФ с избыточным содержанием гранул МПО) и среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК) [8, 9].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета программ *Statistica for Windows 5.0* с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни и коэффициента корреляции Спирмана. Результаты измерений количественных показателей представлены в виде $X \pm \sigma$, где X — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Все добровольцы хорошо перенесли ингаляции гипертонического раствора NaCl, и у всех получена достаточная для исследования порция мокроты. Результаты исследования клеточного состава ИМ у 19 человек (8 — некурящих, 11 — курящих) представлены в табл. 2. Преобладающими в ней клетками являются макрофаги (МФ) и НФ, что совпадает с результатами исследований других авторов [10–15]. При сравнении цитогрaмм ИМ в зависимости от фактора курения статистически достоверные различия были получены по абсолютному содержанию НФ и процентному содержанию лимфоцитов (ЛФ), которых оказалось больше у курящих, а также по процентному содержанию МФ, которых больше у некурящих.

Данные исследования активности протеиназ и их ингибиторов в ИМ и сыворотке крови у 28 здоровых (16 — некурящих, 12 — курящих) представлены в табл. 3. Эти данные совпадают с уже известными [5, 6, 16], что касается мокроты, то таких данных в доступной нам литературе найдено не было.

При сравнении средних показателей, характеризующих активность протеиназ и их ингибиторов в сыво-

Таблица 3
Активность протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и мокроте

Показатель	Сыворотка, n = 28	Мокрота, n = 28
α_1 -протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	$23,8 \pm 13,6$	$0,2 \pm 0,1$
α_2 -макроглобулин, ИЕ/мл	$3,6 \pm 0,8$	$0,1 \pm 0$
Трипсиноподобная активность, нмоль БАЭЭ 1 мин/мл	$106,6 \pm 38,5$	$0,5 \pm 0,2$
Активность эластазы, нмоль БАНЭ 1 мин/мл	$90,0 \pm 30,8$	$0,2 \pm 0,1$
Кислотостабильные ингибиторы, МИЕ/мл	$296,6 \pm 163,3$	$11,4 \pm 7,7$

ротке крови и мокроте курильщиков и некурящих статистически достоверные различия получены только в отношении трипсиноподобных протеиназ. Их активность у курящих и некурящих в сыворотке крови соответственно составила $157,5 \pm 45,5$ и $93,84 \pm 24,7$ ($p = 0,03$), а в мокроте — $0,50 \pm 0,2$ и $0,3 \pm 0,1$ ($p = 0,04$), т. е. у курильщиков имело место явное преобладание трипсиноподобной активности как в сыворотке крови, так и в мокроте.

Данные, полученные в отношении содержания миелопероксидазы в нейтрофилах сыворотки крови у 20 добровольцев (10 курящих, 10 некурящих), представлены в табл. 4. НФ, не содержащих гранулы МПО, не найдено, но как у курящих, так и у некурящих обращает на себя внимание наличие НФ с единичными гранулами МПО, которых, согласно имеющимся данным литературы, в сыворотке у здоровых не должно быть [8]. Средние величины СЦК и НФ, содержащих гранулы МПО, в группах курящих и некурящих достоверно не различались.

Результаты корреляционного анализа взаимосвязей курения с биохимическими показателями сыво-

Таблица 2
Клеточный состав ИМ у здоровых людей

Показатель	Некурящие (n = 8)	Курящие (n = 11)	p
Цитоз, $\times 10^6$ /л	$1,1 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,5$	0,480
МФ, %	$76,7 \pm 14,7$	$56,2 \pm 14,6$	0,040
МФ, абс. $\times 10^6$ /л	$0,9 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,4$	0,640
НФ, %	$23,5 \pm 23,8$	$31,1 \pm 14,4$	0,420
НФ, абс. $\times 10^6$ /л	$0,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	0,029
Эозинофилы, %	$0,6 \pm 0,8$	$1,8 \pm 2,2$	0,220
Эозинофилы, абс.	$0,0 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$	0,250
Лимфоциты, %	$5,6 \pm 2,4$	$10,4 \pm 7,9$	0,026
Лимфоциты, абс. $\times 10^6$ /л	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	0,080
Плоский эпителий, %	$0,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,2$	0,230

Таблица 4
Количество в сыворотке крови нейтрофилов, содержащих гранулы миелопероксидазы

Показатель	n = 20	Курящие n = 10	Некурящие n = 10
НФ +, %	$2,7 \pm 1,4$	$2,3 \pm 0,4$	$3,3 \pm 1,9$
НФ ++, %	$85,2 \pm 6,3$	$82,6 \pm 5,1$	$86,4 \pm 5,4$
НФ +++, %	$11,0 \pm 6,0$	$14,1 \pm 4,4$	$11,2 \pm 6,0$
Средний цитохимический коэффициент	$2,0 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,3$

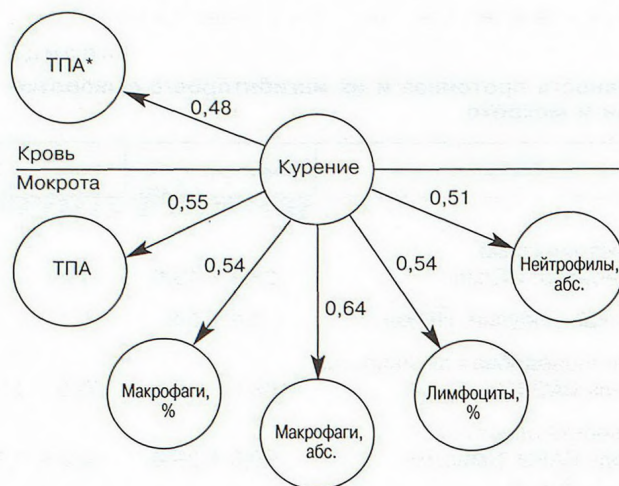


Рис. 1. Корреляционные связи цитологических и биохимических показателей сыворотки крови и мокроты с курением

* — трипсиноподобная активность.

ротки крови и ИМ, а также с ее клеточным составом представлены на рис. 1. Найдены достаточно высокие положительные корреляции между курением и цитологическими и биохимическими показателями, (НФ, ЛФ, МФ) в ИМ и ТПА, как в мокроте, так и в сыворотке крови.

Таким образом, наши исследования показали, что у курящих и некурящих здоровых ИМ и сыворотка крови различается по ряду показателей. У курильщиков найдено более высокое содержание в мокроте НФ и ЛМ, меньшее содержание МФ, повышение трипсиноподобной активности протеиназ как в мокроте, так и в сыворотке крови. Именно между этими показателями и курением существуют достаточно тесные взаимосвязи.

Повышенное содержание воспалительных клеток в бронхиальном секрете, вероятно, является результатом воздействия табачного дыма на слизистую бронхов. Повышение трипсиноподобной активности протеиназ также может быть результатом активации и секреторной дегрануляции НФ как в сыворотке крови, так и в мокроте под влиянием оксидантов табачного дыма [16]. В настоящее время общепризнанным является тот факт, что курение — основная причина воспалительного процесса в центральных и периферических бронхах и легочной паренхиме [17–19]. Повышенную активность протеиназ и их ингибиторов принято рассматривать как доказательство активации нейтрофилов при воспалении. Полученные нами данные можно трактовать как косвенное подтверждение воспалительного процесса в бронхах у курящих, хотя у них и нет клинической картины бронхита. Наши данные также согласуются с данными Saetta M. о том, что группа здоровых курильщиков неоднородна и включает в себя определенную категорию лиц с начальными проявлениями воспаления в слизистой бронхов [19]. Имеются исследования, выполненные с использованием инвазивных методов, способных подтвердить воспаление в бронхах. Эти исследования

свидетельствуют о наличии последнего у курильщиков с нормальными легочными функциями; в частности, в работе P.Maestrelli показано увеличение количества бокаловидных клеток в слизистой бронхов у курильщиков [20].

Выводы

У здоровых курильщиков найдено более высокое, по сравнению с некурящими, содержание в ИМ эффекторных клеток (НФ, ЛФ).

Трипсиноподобная активность как сыворотки крови, так и мокроты достоверно выше у здоровых курящих.

Вышеописанные изменения являются маркерами воспаления и могут косвенно свидетельствовать о наличии хронического бронхита у бессимптомных здоровых курильщиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеев С.Н., Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Применение метода индуцированной мокроты для оценки интенсивности воспаления дыхательных путей. Пульмонология 1998; 2: 81–87.
2. Djukanovic R., Sterk P.J., Fahy J.V., Hargreave F.E. Standardised methodology of sputum induction and processing. Eur. Respir. J. 2002; 20: 1–2.
3. Keatings V.M., Colling P.D., Scott D.M. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996; 153: 530–534.
4. Pin I., Gibson P.G., Kolendowiz R. et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. Thorax 1992; 47: 25–29.
5. Оглоблина О.Г., Платонова Л.В., Пасхина Т.С. Измерение активности трипсина и эластазоподобных протеиназ полиморфно-ядерных лейкоцитов и уровня их кислотостабильных ингибиторов в бронхиальном секрете человека: Метод. рекомендации. М.: МГУ, 1984.
6. Шутов Е.В. Протеиназы и их ингибиторы у больных хронической почечной недостаточностью: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 1981.
7. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека. Вопр. мед. химии 1979; 25: 494–499.
8. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. М.: Медицина, 1987.
9. Astaldi G., Verga L. Acta haematol. (Basel) 1957; 17: 129–136.
10. Belda J., Leigh R., Sears M. Induced sputum cell counts in healthy adults. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 161: 475–478.
11. Jayaram L. et al. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. Eur. Respir. J. 2000; 16: 150–158.
12. Hargreave F.H., Leigh R. Induced sputum, eosinophilic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999; 160: 553–557.
13. Holz O., Kips J., Magnussen H. Update on sputum methodology. Eur. Respir. J. 2000; 16: 355–359.
14. Lensmar C., Elmberger G. et al. Leukocyte counts and macrophage phenotypes in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid from normal subjects. Eur. Respir. J. 1998; 12: 595–600.
15. Kips I., Peleman R., Rauwels R. Methods of examining induced sputum: do differences matter? Eur. Respir. J. 1998; 11: 529–533.
16. Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Чеботарь И.В. и др. Секретирование сериновой связанной с мембраной протеиназы полиморфноядерными лейкоцитами в условиях адгезии на различных типах рецепторзависимых и рецепторнезависимых сорбентов. Вопр. мед. химии 1994; 40: 385–390.

17. Barnes P.I. The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease and chronic asthma. London: National Heart and Lung Institute; 1985.
18. Magnussen H., Hayrgreave F.E. Noninvasive monitoring of airway inflammation. Eur. Respir. J. 2000; 16: 1–2.

19. Saetta M. Airway inflammation in COPD. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999; 160(5): 17–20.
20. Maestrilli P., Saetta M. Remodeling in response to infection and injury airway inflammation and hypersecretion of mucus in smoking subjects with COPD. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 164: 76–80.

Поступила 11.06.03

© СЮРИН С.А., 2004

УДК [616.233–002.2–02:613.84]–074

С.А.Сюрин

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ТАБАКОКУРЕНИЯ НА ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ИММУННУЮ СИСТЕМУ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ БРОНХИТОМ

МСЧ АО "Комбинат Североникель", г. Мончегорск

**EFFECT OF LONG-TERM TOBACCO SMOKING ON LIPID PEROXIDATION
AND IMMUNE SYSTEM IN CHRONIC BRONCHITIS PATIENTS**

S.A.Syurin

Summary

Tobacco smoking is known to play a major role in the pathogenesis of chronic bronchitis (CB). The aim of this investigation was to determine an influence of long-term tobacco smoking on lipid peroxidation (LP) processes, antioxidant activity, and immune status in 122 stable CB patients. The study group included 60 "unconditional" smokers (the smoking history was 19.0 ± 0.7 pack-years). The control group consisted of 62 nonsmokers.

It was found that tobacco smoking resulted in activation of LP processes (an increase in malonyldialdehyde serum level) and to formation of a new oxidant-antioxidant balance at higher level of free radical oxidation. Smoking also had an immunosuppressive effect on local immunity (decrease in secretory IgA and lysozyme levels). Thus, the data obtained confirmed the importance of smoking cessation in the management of CB patients.

Резюме

Известна важная роль курения в патогенезе хронического бронхита (ХБ). Цель работы заключалась в изучении влияния длительного табакокурения на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), антиоксидантную активность и иммунную систему у 122 больных ХБ вне обострения. Основную группу составили 60 "безусловных" курильщиков (анамнез курения $19,0 \pm 0,7$ пачек-лет), а контрольную — 62 некурящих больных.

Установлено, что у больных ХБ длительное курение табака вызывает активацию процессов ПОЛ (повышение уровня малонового диальдегида), приводит к установлению баланса между оксидантами и антиоксидантами на более высоком уровне активности свободнорадикального окисления, оказывает умеренное иммуносупрессивное действие преимущественно на уровне местного звена иммунитета (снижение уровня секреторных IgA и лизоцима). Полученные данные подтверждают важность прекращения курения в лечебных программах для больных ХБ.

Известно, что курение не только является важнейшим фактором риска развития хронического бронхита (ХБ), но и способствует более тяжелому течению заболевания. Многие компоненты табачного дыма оказывают непосредственное повреждающее действие на бронхолегочную ткань, инициируют воспалительный процесс с характерной активацией ней-

трофилов и макрофагов, влияют на баланс протеолитических ферментов и антипротеаз, приводят к развитию оксидативного стресса, иммунодефицитного состояния [1–6].

Целью работы явилось исследование влияния курения на активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и иммунную систему больных ХБ.