



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010122238/15, 31.05.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.05.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.05.2010

(45) Опубликовано: 27.07.2011 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2285264 C2, 10.06.2006. EP 1514945 A1, 16.03.2005. WO 2009097262 A2, 06.08.2009. GRANATA F. et al. Secreted phospholipases A(2): A proinflammatory connection between macrophages and mast cells in the human lung. Immunobiology. 2009; 214 (9-10), p. 811-821. Epub, 2009, Jul, 22. Найдено из БД PubMed, PMID: 19628294. DOMAGALA-KULAWIK J. Effects of (см. прод.)

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, Московский тракт, 2,
СибГМУ, отдел ИС и В, Н.Г. Зубаревой

(72) Автор(ы):

Черногорюк Георгий Эдинович (RU),
Рослякова Елена Петровна (RU),
Михайлова Алла Александровна (RU),
Варвянская Наталья Владимировна (RU),
Санжаровская Мария Сергеевна (RU),
Антипов Сергей Иванович (RU),
Федосенко Сергей Вячеславович (RU),
Фисенко Анна Юрьевна (RU),
Кириллова Наталья Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" (ГОУВПО СибГМУРосздрава) (RU),
Черногорюк Георгий Эдинович (RU),
Рослякова Елена Петровна (RU),
Михайлова Алла Александровна (RU),
Варвянская Наталья Владимировна (RU),
Санжаровская Мария Сергеевна (RU),
Антипов Сергей Иванович (RU),
Федосенко Сергей Вячеславович (RU),
Фисенко Анна Юрьевна (RU),
Кириллова Наталья Александровна (RU)

(54) СПОСОБ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к терапии и пульмонологии, и может быть использовано в качестве способа ранней диагностики хронической обструктивной болезни легких у курящих лиц. Сущность способа: определяют морфометрические характеристики макрофагов, полученных в индуцированной мокроте, для чего проводят определение средней площади клеток. При значении этого

показателя 225 ± 81 мкм² прогнозируют наличие этой патологии у курильщика. Применение способа позволяет диагностировать хронические обструктивные болезни легких на ранней стадии до появления выраженной клинической симптоматики в виде вентиляционных нарушений, что дает возможность своевременно назначить лечение, а также замедлить прогрессирование болезни. 4 табл.

(56) (продолжение):

cigarette smoke on the lung and systemic immunity. J Physiol Pharmacol. 2008, Dec; 59, Suppl 6, p.19-34. Найдено из БД PubMed, PMID: 19218630. Эмфизема легких. Пульмонология, фтизиатрия. Найдено из БД Google, <http://www.medlinks.ru/article.php?sid=34635>, опубли. 24.12.2008.

R U 2 4 2 5 3 6 9 C 1

R U 2 4 2 5 3 6 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010122238/15, 31.05.2010

(24) Effective date for property rights:
31.05.2010

Priority:

(22) Date of filing: 31.05.2010

(45) Date of publication: 27.07.2011 Bull. 21

Mail address:

634050, g.Tomsk, Moskovskij trakt, 2, SibGMU,
otdel IS i V, N.G. Zubarevoj

(72) Inventor(s):

Chernogorjuk Georgij Ehdinovich (RU),
Rosljakova Elena Petrovna (RU),
Mikhajlova Alla Aleksandrovna (RU),
Varvjanskaja Natal'ja Vladimirovna (RU),
Sanzharovskaja Marija Sergeevna (RU),
Antipov Sergej Ivanovich (RU),
Fedosenko Sergej Vjacheslavovich (RU),
Fisenko Anna Jur'evna (RU),
Kirillova Natal'ja Aleksandrovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovaniya
"Sibirskij gosudarstvennyj meditsinskij
universitet Federal'nogo agentstva po
zdravookhraneniju i sotsial'nomu razvitiju"
(GOUVPO SibGMURoszdrava) (RU),
Chernogorjuk Georgij Ehdinovich (RU),
Rosljakova Elena Petrovna (RU),
Mikhajlova Alla Aleksandrovna (RU),
Varvjanskaja Natal'ja Vladimirovna (RU),
Sanzharovskaja Marija Sergeevna (RU),
Antipov Sergej Ivanovich (RU),
Fedosenko Sergej Vjacheslavovich (RU),
Fisenko Anna Jur'evna (RU),
Kirillova Natal'ja Aleksandrovna (RU)

(54) EARLY DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: morphometric characteristics of macrophages produced in an induced sputum are evaluated by calculating an average cell area. If the value is 225 ± 81 mcm², the presence of this pathology in a smoker is predicted. The use of the

method allows early diagnosing of chronic obstructive pulmonary disease before observing the manifested clinical symptomatology presented by ventilation disturbances.

EFFECT: enabled well-timed prescription of the therapy and delayed progression of the disease.

4 tbl

Изобретение относится к области медицины, а именно к терапии и пульмонологии, и может быть использовано в качестве способа ранней диагностики хронической обструктивной болезни легких у курящих лиц.

Согласно рекомендациям GOLD от 2007 года «...диагноз ХОБЛ следует заподозрить у всех пациентов с одышкой, хроническим кашлем или выделением мокроты и/или с воздействием характерных для этой болезни факторов риска в анамнезе. Диагноз должен быть подтвержден с помощью спирометрии. Этот метод исследования пациентов является на сегодняшний день «золотым стандартом» для диагностики и оценки ХОБЛ, так как она является наиболее воспроизводимым, стандартизованным и объективным способом измерения ограничения скорости воздушного потока». По клиническим данным и показателям спирометрии диагностику этого заболевания предлагается проводить и по федеральной программе, подготовленной по инициативе Российского респираторного общества [1].

Особенность ХОБЛ состоит в том, что длительность развития заболевания может насчитывать несколько десятилетий. Заболевание долго не дает клинических проявлений и протекает бессимптомно. Поэтому необходим метод, который позволил бы заподозрить наличие этого заболевания у пациента на ранних этапах, когда клинических признаков еще нет, а патологический процесс уже запущен.

Известен способ экспресс-диагностики структурных изменений в легких при хронической обструктивной болезни легких, при котором регистрируют излучение легких [2]. Для этого предварительно готовят биологический индикатор, состоящий из 0,1% водного раствора смеси аминокислот - аспарагиновой, глутаминовой, глицина, триптофана, валина, лейцина, треонина, серина, 0,5% водного раствора трипсина, 0,5% раствора дофамина, 0,25% водного раствора натриевой соли ДНК, 12% водного раствора сернокислой магнелии в соотношении 3:1:1:1:4, который наносят на 4 стеклянные пластины. Помещают по две пластины в подключичную зону во 2-е межреберье слева и справа, выдерживают на протяжении 2-3 минут, сушат при $T=+18-20^{\circ}\text{C}$, исследуют в поляризованном свете с кварцевым компенсатором. При наличии в препаратах островковых и/или щелевидных включений, окруженных по периферии сетчато-ячеистой короной, диагностируют структурные изменения в легких, присущие ХОБЛ. Использование способа позволяет повысить информативность и оперативность регистрации в динамике структурной перестройки в легких, обусловленной ХОБЛ.

Недостатком этого способа диагностики является его техническая сложность и невозможность ранней диагностики болезни, то есть до периода появления спирометрических показателей, характерных для ХОБЛ.

Наиболее близким к предлагаемому является способ ранней неинвазивной диагностики процессов ремоделирования бронхов при хронической обструктивной болезни легких у мужчин [3]. В слюне определяют концентрацию трансформирующего фактора роста - 1 (ТФР-1) методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора стандартов для определения ТФР-1. При увеличении значения показателя ТФР-1 в 2,4 и более раз по сравнению с показателем, считающимся нормой для здорового пациента, диагностируют ремоделирование бронхов. При этом показатель, считающийся нормой для здорового пациента, величину ТФР-1, равную $403,88 \pm 102,58$ пг/мл, выбирают, сравнивая с нормой для здорового пациента, показателя ОФВ1 и результатов биопсии бронха. Использование способа позволяет повысить информативность, достоверность и безопасность диагностирования ремоделирования бронхов у мужчин, обеспечить возможность применения диагностики на ранних

стадиях морфологических процессов в бронхах.

Недостатком известного способа является то, что ремоделирование бронхов происходит на поздних этапах развития болезни, и процесс идет параллельно изменению спирометрических показателей.

Новая техническая задача - создание способа, позволяющего диагностировать хроническую обструктивную болезнь легких до появления выраженной клинической симптоматики в виде вентиляционных нарушений.

Для решения поставленной задачи в способе ранней диагностики хронической обструктивной болезни легких у курящих лиц путем исследования биологической жидкости пациента, определяют морфометрические характеристики макрофагов, полученных в индуцированной мокроте, для чего проводят определение средней площади клеток и при значении этого показателя $225 \pm 81 \text{ мкм}^2$ прогнозируют наличие этой патологии у курильщика.

Способ осуществляют следующим образом:

Получение индуцированной мокроты

Индуцированную мокроту получают после ингаляций 3-5% стерильного раствора натрия хлорида через небулайзер. Не позднее, чем через 2 часа после забора мокроты проводят ее исследование.

Затем проводят диспергирование и гомогенизацию мокроты, для этой цели применяют инкубацию мокроты с 1% раствором трипсина в термостате и ее механическую гомогенизацию. Затем клеточную суспензию отмывают в 0,9% растворе натрия хлорида и центрифугируют. Из полученного осадка готовят мазки в количестве 3-4 от одного больного. Мазки окрашивают модифицированным методом Е.В.Пигаревского.

Определение морфометрических характеристик макрофагов

В световом микроскопе при увеличении $\times 1000$ цифровой фотокамерой Sony DSC-S70, с максимальным разрешением, производят фотографирование макрофагов в мазках индуцированной мокроты и периферической крови. После чего скенограмму импортируют в программу Adobe Photoshop. С помощью пакета программ Photoshop SC производят следующие действия:

1. Функцией «лассо» выделяют макрофаг.

2. В функции «гистограмма» считывают показатель площади клеток в пикселях.

3. Функцией «волшебная палочка» выделяют и измеряют его ядро в пикселях, затем его «удаляют».

4. Измеряют площадь цитоплазмы клетки в пикселях.

5. Переводят показатели, выраженные в пикселях в метрическую систему, в мкм^2 .

Заключение о морфометрических параметрах макрофагов представляют в виде средней величины и ошибки средней величины ($M \pm m$), которые получают на основании морфометрии не менее 40 макрофагов и при средней площади клеток 225 ± 81 прогнозируют наличие ХОБЛ у пациента.

Предлагаемый способ ранней диагностики ХОБЛ у длительно курящих лиц поясняется конкретными примерами.

Пример № 1. Мужчина К., 53 года. Обследование проводилось в порядке очередного профосмотра. Профессия - электромонтажник. Курение в анамнезе отрицает. Жалоб не предъявлял. Объективное обследование органов дыхания: грудная клетка правильной формы, симметрично активна в дыхании, перкуторно над легкими легочный звук, дыхание везикулярное, хрипы не выслушиваются. Заключение: при физическом обследовании органов дыхания патологических изменений не

выявлено. Общий анализ крови: лейкоциты - $6,7 \times 10^9/\text{л}$; эритроциты - $5,32 \times 10^{12}/\text{л}$; гемоглобин - 136 г/л; тромбоциты - $250 \times 10^9\%$; СОЭ - 6 мм/час; лейкоцитарная формула: палочкоядерные нейтрофилы - 4%, сегментоядерные нейтрофилы - 67%, эозинофилы - 1%, базофилы - 0%, моноциты - 1%, лимфоциты - 27%. Анализ мочи: цвет - соломенно-желтый, прозрачная, плотность - 1022, белок - не определяется, сахара - не определяются; микроскопия: лейкоциты 1-1-0, эритроциты 1-0-0 в поле зрения. Заключение: показатели общего анализа крови, мочи в пределах нормы. ЭКГ: ритм синусовый, правильный, ЧСС - 72 в 1 минуту, электрическая ось сердца не отклонена; заключение: ЭКГ в пределах нормы. Согласно предлагаемому способу было проведено исследование индуцированной мокроты для определения морфометрических характеристик макрофагов, выявленных в ней. Было установлено, что средняя площадь изучаемых клеток составила $477 \pm 52 \text{ мкм}^2$, что позволяет отвергнуть риск развития ХОБЛ у пациента. При углубленном обследовании пациенту была проведена спирография, показатели которой составляли: ОФВ-1 - 86,2% от должных величин, индекс Тиффно - 78,6%, что соответствует норме. На этом основании сделано заключение об отсутствии хронической обструктивной болезни легких. При последующих профосмотрах в течение 2 лет диагноз ХОБЛ также не был подтвержден.

Пример № 2. Пациент С., мужчина, 55 лет, преподаватель. Стаж курения 31 год. Наблюдался в течение 2 лет. Предъявлял жалобы на продуктивный кашель в течение дня, больше в утренние часы. Последние 2 года стал отмечать одышку при повышенной физической нагрузке. Общий анализ крови: лейкоциты - $7,2 \times 10^9/\text{л}$; эритроциты - $5,65 \times 10^{12}/\text{л}$; гемоглобин - 155 г/л; тромбоциты - $228 \times 10^9\%$; СОЭ - 8 мм/час; лейкоцитарная формула: палочкоядерные нейтрофилы - 2%, сегментоядерные нейтрофилы - 63%, эозинофилы - 2%, базофилы - 0%, моноциты - 1%, лимфоциты - 33%. Анализ мочи: цвет - желтый, прозрачная, плотность - 1024, белок - не определяется, сахара - не определяются; микроскопия: лейкоциты 0-1-0, эритроциты 0-1 в поле зрения. Заключение: показатели общего анализа крови, мочи в пределах нормы. ЭКГ: ритм синусовый, правильный, ЧСС - 66 в 1 минуту, отклонение электрической оси сердца влево, ЭКГ в пределах нормы. За время наблюдения трижды проводилось исследование индуцированной мокроты для определения морфометрических характеристик макрофагов в ней по предлагаемому способу. Средняя площадь макрофагальных клеток составила $225 \pm 81 \text{ мкм}^2$, что позволяло прогнозировать у С. высокую вероятность наличия хронической обструктивной болезни легких, учитывая большую длительность курения. В первые 1,5 года наблюдения показатели спирографии находились в пределах нормы: ОФВ-1 составлял 81-84% от должных величин, индекс Тиффно - был более 70%. На основании этого у пациента диагностировался хронический необструктивный бронхит. Два года спустя от начала обследования на спирограммах было выявлено снижение вентиляционных показателей: ОФВ-1 до 65% от должной величины, индекса Тиффно до 68,2%. Спирографическая проба с бронхолитиками была отрицательна, что свидетельствовало о необратимости бронхиальной обструкции. Указанные функциональные тесты в совокупности с клинической картиной заболевания (появление одышки при повышенной физической нагрузке, продуктивный кашель) соответствовал диагнозу: хроническая обструктивная болезнь легких 2 стадии, стабильная фаза. Таким образом, высокая вероятность наличия хронической обструктивной болезни легких у пациента С. до появления отклонений по данным

спирографии, выявленная по предлагаемому способу на основании стабильно маленькой средней площади макрофагов в индуцированной мокроте, была подтверждена появлением изменений по данным спирографии, характерных для ХОБЛ.

Предлагаемые критерии основаны на анализе данных клинических исследований, а также результатах исследования данных литературных источников.

В обследование было включено 60 пациентов с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких, находившихся на лечении в пульмонологическом отделении ОГУЗ Томская областная клиническая больница, в клиниках ФГОУ ВПО Томского военно-медицинского институт МО РФ с 2005 по 2008 г., а также 84 практически здоровых добровольцев.

Диагноз ХОБЛ устанавливался согласно критериям GOLD (2003). Контингент здоровых в зависимости от ирритативного фактора представлен четырьмя группами обследуемых: здоровые, никогда некурящие мужчины ($n=20$, возраст 39-57 лет, средний возраст - $48,6 \pm 1,4$ лет), практически здоровые курящие с относительно коротким анамнезом курения 5-15 пачка/лет ($n=41$, возраст 20,0-53 года, средний возраст - $33,4 \pm 1,1$ лет), практически здоровые курящие с длительным анамнезом курения более 25 пачка/лет ($n=23$, возраст 40-56 лет, средний возраст $47,2 \pm 0,6$ лет). Длительное курение у части пациентов последней группы инициировало развитие необструктивного хронического бронхита, проявляющегося непостоянным утренним кашлем с выделением слизистой мокроты в небольшом количестве (20 пациентов). Для представителей групп курящих возможен кашлевой синдром.

Условиям для включения в группу здоровых, никогда не курящих были: отсутствие кашлевого анамнеза, бронхиальной астмы, бронхита, патологических изменений при обзорной рентгенографии легких, нормальные показатели функции внешнего дыхания по данным спирографии, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних трех месяцев.

Условия включения в группы здоровых курящих были: соответствующий анамнез курения, отсутствие бронхиальной астмы, бронхита, других атопических заболеваний, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних трех месяцев, нормальные показатели функции внешнего дыхания по данным спирографии.

Интенсивность курения оценивалась анамнезом курящего человека (пачка/лет: число выкуриваемых сигарет в сутки $\times$ стаж курения (годы)/20).

В группу больных были включены 60 человек с диагнозом ХОБЛ вне обострения в возрасте от 41 до 70 лет, средний возраст $57,1 \pm 1,7$ года. Диагноз основывался на данных анамнеза, клинической картины заболевания (кашель, продукция мокроты, одышка, сухие хрипы, клинические признаки эмфиземы), показателях функции внешнего дыхания (ОФВ1, индекс Тиффно). Длительность заболевания от 4 до 42 лет, средняя длительность заболевания составила $22,5 \pm 8,2$ года. По стадиям ХОБЛ согласно GOLD 2003 год, больные распределились следующим образом: II-я стадия - 8 человек, III-я стадия - 25, IV-я стадия - 27. Среднее значение ОФВ1 для всех больных составило $37,1 \pm 4,8\%$ к должным величинам. Среднее значение ОФВ1 для больных со 2-ой стадией - $66,2 \pm 2,0$, с 3-ей стадией - $39,3 \pm 4,2$, с 4-ой стадией - $18,2 \pm 3,2$. Все пациенты с ХОБЛ либо продолжающие курить, либо бывшие курильщики. Интенсивность курения составляла от 20 до 100 пачек/лет. Средний индекс - $38,8 \pm 2,1$ пачек/лет, что позволяет отнести обследованных больных к категории злостных курильщиков.

В исследование не включались пациенты с наличием атопических заболеваний, заболеваний воспалительного характера (пневмония и т.д.), с заболеваниями

сердечнососудистой системы и выраженной сердечной недостаточностью (III IV ФК по NYHA), другими тяжелыми сопутствующими заболеваниями. Клиническое обследование пациентов проводилось в соответствии с регламентом GOLD 2003, 2006. Весь контингент обследованных представлен мужчинами. На выполнение всех процедур было получено письменное согласие всех больных ХОБЛ и всех здоровых добровольцев.

Результаты исследования:

Средняя величина площади макрофагов в индуцированной мокроте при ХОБЛ, а также площадь цитоплазмы и ядра, как указано в таблице 1, статистически значимо меньше по сравнению с группой здоровых некурящих и с группами курящих без ХОБЛ. Статистически значимых различий по этим показателям между группами здоровых, никогда не курящих и курящих с различным стажем курения без ХОБЛ выявлено не было.

Как указано в таблице 2, из 60 пациентов с ХОБЛ средняя площадь макрофагов, составляющая, $225 \pm 81 \text{ мкм}^2$ встретилась в 52 случаях, что составило 86,7% от общего числа людей, включенных в исследование. У 20 здоровых обследованных никогда не курящих средняя величина этих клеток $225 \pm 81 \text{ мкм}^2$ не была выявлена. У курящих средняя площадь макрофага, соответствующая $225 \pm 81 \text{ мкм}^2$, встретилась в 7 случаях, что составило 10,9% от общего числа обследуемых.

Для предлагаемого способа ранней диагностики ХОБЛ проведен анализ диагностической значимости предлагаемого диагностического теста, что видно из таблиц 3 и 4. Как у не курящих, так и у курящих этот способ ранней диагностики ХОБЛ демонстрирует высокие показатели чувствительности, специфичности и прогностической значимости.

Таким образом, предлагаемый способ ранней диагностики ХОБЛ у курящих заключается в определении средней площади макрофагов в индуцированной мокроте. При величине этого показателя $225 \pm 81 \text{ мкм}^2$ вероятность заболевания у курящих составляет 88%.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) признана приоритетной сферой для менеджмента здравоохранения и развития новых терапевтических стратегий. Это связано с высокой заболеваемостью и смертностью, ассоциированными с этим состоянием. ХОБЛ стоит на четвертом месте по уровню заболеваемости и смертности, и предполагается, что выйдет на пятое место в 2020 г. по ущербу, наносимому болезнями в глобальном масштабе [4]. По официальным данным МЗ РФ в стране насчитывается 1 млн больных ХОБЛ, в то время как согласно эпидемиологическим исследованиям их должно быть более 11 млн [5, 6]. Хроническая обструктивная болезнь легких приводит к инвалидизации в среднем через 10 лет после установления диагноза и более чем в половине случаев - это лица моложе 50 лет [5].

Известно, что ведущим этиологическим фактором развития ХОБЛ является курение, и что заболевание развивается примерно у 15-20% курящих. У курильщиков сигарет наблюдается повышенная распространенность респираторных симптомов и расстройств легочной функции, повышенное годовичное снижение ОФВ1 и повышенная смертность от ХОБЛ по сравнению с некурящими. Для этой категории характерен дозозависимый риск развития ХОБЛ [7].

К большому сожалению, больные ХОБЛ обращаются за медицинской помощью уже на поздних стадиях заболевания, когда возможности терапии крайне ограничены. Основным критерием диагностики ХОБЛ в настоящее время является ограничение

скорости воздушного потока в бронхах, определяемое при спирографическом обследовании больного. Вместе с тем известно, что болезнь развивается задолго до проявления ее в виде ограничения скорости воздушного потока. Существует субклинический период заболевания, который может продолжаться от 3-4 до 10 лет. В этот период пациент обычно не обращается за медицинской помощью и, как следствие, не предпринимаются активные меры по устранению (минимизации) действия внешних факторов риска. Таким образом, факторы риска продолжают действовать на пациента на протяжении длительного времени, затрагивая не только респираторную систему [8]. В связи с этим есть необходимость в достоверных и доступных тестах, позволяющих в донозологический период показать, что у конкретного курильщика с высокой степенью вероятности может развиваться ХОБЛ.

В документе «Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2007 г.)» указано, что «...развитие ХОБЛ связано с патологическим воспалительным ответом легких на действие ингалируемых частиц или газов». Компоненты табачного дыма оказывают непосредственное повреждающее действие на бронхолегочную ткань, инициируют воспалительный процесс с активацией нейтрофилов и макрофагов, влияют на баланс протеолитических ферментов и антипротеаз, приводят к развитию оксидативного стресса. Развитие ХОБЛ является результатом взаимодействия генетических факторов и воздействия факторов окружающей среды.

Поиск биомаркеров воспаления в субклинический период заболевания, ассоциированных с риском формирования ХОБЛ, может исходить из того, что у части курящих, без основного клинического признака ХОБЛ - ограничения скорости воздушного потока в бронхах, характеристики воспаления в бронхиальном регионе, инициированные табачным дымом, могут быть идентичны таковым при клинически выраженной болезни.

Макрофаги играют центральную роль в патофизиологии ХОБЛ и могут объяснить наиболее характерные черты этого заболевания [9, 10]. Замечено увеличение в 5-10 раз количества макрофагов в дыхательных путях, легочной паренхиме, жидкости БАЛ и мокроте у пациентов с ХОБЛ. Анализ количества макрофагов в паренхиме пациентов с эмфиземой показал 25-кратное повышение количества макрофагов в тканях и альвеолярном пространстве по сравнению со здоровыми курильщиками [11]. Более того, макрофаги локализовались в участках деструкции альвеолярной стенки у пациентов с эмфиземой [12, 13]. Существует корреляция между количеством макрофагов в дыхательных путях и тяжестью ХОБЛ [14]. Макрофаги могут быть стимулированы экстрактом сигаретного дыма к выделению воспалительных медиаторов, в том числе ФНО- α , Ил-8, других хемокинов, моноцитарного хемотаксического пептида, лейкотриена В₄, свободных радикалов кислорода, обеспечивая механизм, связывающий курение с воспалением при ХОБЛ.

Альвеолярные макрофаги также секретируют эластолитические ферменты, включая ММР-2, ММР-9, ММР-12, катепсины и нейтрофильную эластазу, поглощенную из нейтрофилов [15, 16, 17]. Известно, что макрофаги у больных ХОБЛ по своим морфофункциональным свойствам отличаются от макрофагов здоровых и курящих. Так, макрофаги больных ХОБЛ имеют большую эластолитическую активность, чем у здоровых курильщиков [16, 17, 18]. Макрофаги при ХОБЛ демонстрировали эту особенность в культуре в течение трех дней и, следовательно, существенно отличались от макрофагов здоровых курильщиков и здоровых не курящих [16, 17].

Цитопроточным методом было установлено, что при ХОБЛ в индуцированной

мокроте 45,7% макрофагов имеют малую величину. У здоровых «малые» макрофаги составляют 6,9% всех макрофагов. Фенотипы малых и больших макрофагов различались по CD и HLA-DR маркерам [19]. Макрофаги имеют способность изменять фенотип их поверхности [20, 21] и функциональные свойства в ответ на экзогенный стимул и/или патологический процесс в легочной паренхиме [22, 23].

Таким образом, предлагаемый способ позволяет диагностировать болезнь на раннем этапе, что позволит выявлять среди курильщиков субъектов, которые эволюционируют к клинически выраженной стадии заболевания, проявляющейся ограничением скорости воздушного потока. Своевременная медицинская помощь этим лицам предотвратит формирование ХОБЛ или, по крайней мере, замедлит ее прогрессирование.

Источники информации

1. Федеральная программа по ХОБЛ. / Под редакцией Чучалина А.Г. - М.: 2004.
2. RU 230655 C1, Савина Л.В. и др. "Способ экспресс-диагностики структурных изменений в легких при хронической обструктивной болезни легких", 2007.09.20.
3. RU 228526 C2, Степанищева Л.А. и др. "Способ ранней неинвазивной диагностики процессов ремоделинга бронхов при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) у мужчин", 2006.10.10.
4. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2007 г.) / Пер. с англ. под ред. Чучалина А.Г. - М.: Издательский дом «Атмосфера», 2008. - 100 с., ил.
5. Федеральная программа по ХОБЛ. / З.Р.Айсонов, А.Н.Кокосов, С.И.Овчаренко и др. // Русский медицинский журнал. - 2001. - Том 9. - № 1. - С.9-32.
6. Чучалин А.Г. Хронические обструктивные болезни легких // Хроническая обструктивная болезнь легких. Под ред. А.Г.Чучалина. М, 1998.
7. Schols, AM. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. / AM.Schols, PB.Soeters, AM.Dingemans, R.Mostert, PJ.Frantzen, EF.Wouters // Am Rev Respir Dis. - 1993. Vol.147 (5). - P.1151-1156.
8. Шмелев, Е.И. Воспаление - ключевой элемент прогрессирования хронической обструктивной болезни легких / Е.И.Шмелев // Consilium medicum. - 2003. - Т.7. - № 4. - С.5-7.
9. Keatings, VM. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. / VM.Keatings, DJ.Evans, BJ.O'Connor, PJ. Bams. // Thorax. - 1997. - Vol.52. - P.372-374.
10. Ollivier, FJ. Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis / FJ.Ollivier, DE.Brooks, ME.Kallberg, AM.Komaromy, ME.Lassaline // Am. J. Vet. Rcs. - 2003. - Vol.64(9). - P.1081-1087.
11. Repine, JE. Oxidative stress in COPD. / JE.Repine, A.Bast // Am. J. Respir. Crit. Cam Med. - 1997. - Vol.156. - P.341-357.
12. Finkelstein, E.I. Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease? / E.I.Finkelstein, M.Nardini, A.van der Vliet // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. - 2001. - Vol.281. - P.732-739.
13. Mercken, EM. Rehabilitation Decreases Exercise-induced Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / EM.Mercken, GJ.Hageman, AM.Schols et al. // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. - 2005. - Vol.172. - P.994-1001.
14. Di Stefano, A. Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. / A.Di Stefano, G.Turato, P.Maestrelli,

CE.Mapp, et al. // Am J Respir Crit Care Med. - 1996. - Vol.153. - P.629-632.

15. Pryzwansky, KB. Early degranulation of human neutrophils: immunocytochemical studies of surface and intracellular phagocytic events. / KB.Pryzwansky, EK.MacRae, JK.Spitznagel, MH.Cooney // Cell. - 1979. - Vol.18. - P.1025-1033.

5 16. Rubin, BK. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease / BK Rubin, MO. Henke // Chest. - 2004. - Vol.125. - P.70-78.

17. Russell, RE. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. / RE.Russell, SV.Culpitt, C.DeMatos, L.Donnely, et al. // Am J Respir Cell Mol Biol. - 10 2002. - Vol.26. - P.602-609.

18. Lemanske, RF. Asthma. / RF. Lemanske, WW. Busse// JAMA. - 1997. - Vol.278. - P.1855-1873.

15 19. Frankenberger, M. Characterization of a population of small macrophages in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers / M.Frankenberger, M.Menzel, R.Betz, G.Kassner, N.Weber, M.Kohlhäufel, K.Häussinger, L. Ziegler-Heitbrock // Clin. Exp.Immunol. - 2004. - Vol. Dec; 138(3): - P.507-16.

20 20. Bank, U. Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation / U.Bank, B.Kupper, D.Reinhold // FEBS Lett. - 1999. - Vol.46. - P.235-240.

21. Sparrow, D. The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. / D.Sparrow, RJ.Glynn, M.Cohen, ST.Weiss. // Chest. - 1984. - Vol.86. - P.383-386.

25 22. Sommerhoff, CP. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. / CP.Sommerhoff, JA.Nadel, CB.Basbaum, GH.Caughey // J.Clin.Investig. - 1990. - Vol.85. - P.682-689.

23. Tauber, AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. / AI.Tauber // Nat Rev Mol Cell Biol. - 2003. - Vol.4. - P.897-901.

Приложение:

Таблица 1					
Морфометрический показатель макрофагов (мкм ²)	Здоровые, никогда некурящие n=20	Здоровые курящие, анамнез курения более 25 лет n=23	Здоровые курящие, анамнез курения 5-15 лет n=41	ХОБЛ n=60	p
	1	2	3	4	
Площадь клетки	477±92	435±114	422±91	225±81	p ₁₋₄ <0,0001 p ₂₋₄ <0,0001 p ₃₋₄ <0,0001 p ₁₋₂ >0,05 p ₁₋₃ >0,05 p ₂₋₃ >0,05
Площадь цитоплазмы	375±77	335±96	334±62	171±63	p ₁₋₄ <0,0001 p ₂₋₄ <0,0001 p ₃₋₄ <0,0001 p ₁₋₂ >0,05 p ₁₋₃ >0,05 p ₂₋₃ >0,05
					p ₁₋₄ <0,0001

Площадь ядра	102±15	100±19	89±14	54±18	$p_{2-4} < 0,0001$ $p_{3-4} < 0,0001$ $p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
--------------	--------	--------	-------	-------	--

Таблица 2							
Морфометрический показатель макрофагов (площадь клетки 225±81 мкм ²)	Здоровые, некурящие n=20		Здоровые, курящие, анамнез курения 10,9±2,1 п/лет n=64		ХОБЛ n=60		Р
	Абсол. кол-во	%	Абсол. кол-во	%	Абсол. кол-во	%	
Частота встречаемости	1		2		3		
	0	0	7	10,9	52	86,7	<0,00001

Таблица 3	
Показатели	Значения
Чувствительность	87%
Специфичность	100%
Положительное прогностическое значение	100%
Отрицательное прогностическое значение	71%
Значимость теста	87

Таблица 4	
Показатели	Значения
Чувствительность	87%
Специфичность	89%
Положительное прогностическое значение	88%
Отрицательное прогностическое значение	88%
Значимость теста	7,9

Формула изобретения

Способ ранней диагностики хронической обструктивной болезни легких у курящих лиц путем исследования биологической жидкости пациента, отличающийся тем, что определяют морфометрические характеристики макрофагов, полученных в индуцированной мокроте, для чего проводят определение средней площади клеток, и при значении этого показателя 225±81 мкм² прогнозируют наличие этой патологии у курильщика.