

# Биомаркеры конденсата выдыхаемого воздуха при ХОБЛ

Э.Х. Анаев, Т.Н. Анохина, М.Э. Гаджиева

**Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)** характеризуется воспалением дыхательных путей и прогрессирующим ограничением воздушного потока. Несмотря на значительный прогресс в лечении заболевания, в настоящее время нет лекарственных средств, способных приостановить прогрессирование болезни. Имеется необходимость в разработке препаратов, влияющих на хронический воспалительный процесс, и существует несколько классов лекарственных средств с новыми механизмами действия, которые находятся в стадии клинических испытаний.

Биомаркеры играют важную роль в современных научных исследованиях [23]. Хроническая обструктивная болезнь легких является гетерогенным заболеванием, при котором использование биомаркеров может помочь в определении различных фенотипов заболевания, долгосрочных прогнозов и ответа на терапевтическое воздействие [3, 27]. Для ХОБЛ специфические биомаркеры до сих пор не определены [20]. Предполагаемые биомаркеры ХОБЛ включают нейтрофилез мокроты, который является предиктором ухудшения функции легких, и эозинофилию мокроты, указывающую на возможность эффективного лечения **глюкокортикостероидами (ГКС)** [5, 12, 32]. Другие биомаркеры могут помочь при диагностике и мониторинге обострений ХОБЛ [18, 42]. Существует необходимость в установлении диагностических биомаркеров для контроля за лечением, как, например, гликированный гемоглобин при сахарном диабете или тропонин при остром коронарном синдроме.

В последние годы отмечается возрастающий интерес к исследованию легких при помощи неинвазивных методов, включая измерение биомаркеров в выдыхаемом воздухе, в том числе **оксида азота (NO)** и образующегося при охлажденном и конденсированном испарении так называемого **конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ)** [16, 44].

Конденсат выдыхаемого воздуха состоит из комплекса биомаркеров с разными химическими свойствами [15, 16, 19, 23]. Содержание многих маркеров в КВВ находится на границе определяемых значений, что обуславливает большую вариабельность данных [46, 49]. Из-за низкого содержания белка и разного химического состава КВВ для проведения иммунологических исследований (определение цитокинов и других маркеров) требуются доказательные методы. Для улучшения репродуктивности методов необ-

ходимо концентрирование образцов, а также разработка более чувствительных технологий [16, 34].

Сбор КВВ является полностью неинвазивным методом получения материала из дыхательных путей, который можно выполнять повторно через короткие промежутки времени. Аппарат для получения КВВ портативен, подходит для сбора материала у пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких, в амбулаториях, на рабочем месте и в домашних условиях. Сбор КВВ не влияет на функцию легких, уровень выдыхаемого NO и других медиаторов. Так как дыхание во время сбора КВВ остается спокойным, данный метод более безопасен, чем измерение легочной функции, которое может спровоцировать бронхоспазм у пациентов с обструктивными заболеваниями легких [16]. Всё это делает сбор КВВ одним из эпидемиологических методов исследования патологических процессов (окислительного стресса и воспаления) при изучении болезней органов дыхания [15, 32].

## Методологические вопросы сбора и анализа КВВ при ХОБЛ

Конденсат выдыхаемого воздуха содержит много компонентов, основным из которых является выдыхаемая влага: она составляет 99% объема КВВ. Лишь небольшая ее фракция представлена нелетучими молекулами, которые могут быть гидрофильными и гидрофобными. Летучие водорастворимые частицы при конденсации адсорбируются вместе с водой. Во время сбора КВВ выдыхаемый воздух направляется непосредственно в охлаждающую камеру, где собирается в виде влаги. Во время дыхания выдыхаемые частицы распыляются в виде аэрозоля плотностью 0,1–4,0 частиц/см<sup>3</sup> со средним диаметром частиц 0,3 мкм, но при этом не учитываются более мелкие частицы, которые тоже могут содержать различные вещества [16].

## Приборы для сбора КВВ

Для сбора КВВ наиболее широко используются коммерческие устройства: конденсор ECoScreen (Erich Jaeger, Германия) и трубка R-tubes (Respiratory Research Inc., США), некоторые лаборатории используют свои самодельные аппараты. Оптимальным является применение коммерческих моделей, так как это позволяет избежать многих проблем. Коммерческие модели имеют односторонний клапан, который предотвращает случайное попадание охлажденного воздуха из конденсора при вдохе. Этот маневр необходим для предотвращения смешивания воздуха. Аппарат должен быть снабжен уловителем слюны с ротовым загубником, который имеет входную (ингаляционную) и выходную части. Использование фильтра не рекомендуется, так как он может стать ловушкой моле-

Лаборатория неинвазивных методов диагностики НИИ пульмонологии ФМБА России.

**Эльдар Хусеевич Анаев** – докт. мед. наук, зав. лабораторией.

**Татьяна Николаевна Анохина** – науч. сотр.

**Миясат Эльдаровна Гаджиева** – мл. науч. сотр.

кул, содержащихся в выдыхаемом воздухе [16]. Наличие одностороннего клапана и использование одноразовых устройств ограничивают риск инфекции.

### Процедура сбора КВВ

Сбор КВВ является безопасным методом получения информации о состоянии респираторного тракта. В 10 000 измерений, выполненных в различных лабораториях с применением разных устройств и способов, не было зафиксировано никаких нежелательных явлений. До настоящего времени не отмечались побочные эффекты у пациентов с тяжелым течением или обострением ХОБЛ [2, 20]. Сбор КВВ имеет преимущества перед получением бронхоальвеолярного лаважа, так как, во-первых, является неинвазивным методом, а во-вторых, не требуется вводить медикаменты в дыхательные пути перед проведением процедуры. Жидкость, покрывающая альвеолярный эпителиальный слой (alveolar lining fluid – ALF), находится в образцах КВВ в большом разведении. В образцах могут определяться не только альвеолярные компоненты ALF, но и составляющие слизистого слоя дыхательных путей [16].

Сбор КВВ проводится с использованием носового зажима, который позволяет предупредить любой случайный дыхательный маневр через нос (вдох или выдох), что является надежным способом защиты от попадания медиаторов из носовой полости. Использование носового зажима сводит до минимума попадание частиц из носоглотки и предотвращает потерю материала через носовую полость [16].

Продолжительность процедуры сбора КВВ, как правило, составляет 10–30 мин, причем в большинстве случаев используется 10-минутный период. В среднем за 10 мин спокойного дыхания у взрослого человека можно получить 1–3 мл КВВ (средний объем КВВ – 100 мкл/мин, диапазон – 40–300 мкл/мин). Ни одна из имеющихся моделей не позволяет собрать все выдыхаемые водные пары, поскольку потеря влаги в среднем составляет 30–35 мг/л при разных значениях температуры и влажности окружающего воздуха [16]. При сравнении данных здоровых людей и больных ХОБЛ установлено, что примерно 40% водных паров выделяется без какого-либо влияния на состав КВВ [21].

### Биомаркеры КВВ

Была установлена связь объема КВВ с содержанием в нем общего белка и мочевины. В дальнейшем многими авторами была выявлена высокая корреляция объема выдыхаемого воздуха с объемом КВВ. Была предложена альтернатива сбора КВВ в 100 л выдыхаемого воздуха вместо определенного фиксированного времени [21].

Объем полученного КВВ возрастает с увеличением минутной вентиляции и/или дыхательного объема [35, 48]. Возможно, это отражает увеличение объема выдыхаемого воздуха или связано с более высокой турбулентностью аэрозолизации ALF. В исследованиях состава КВВ при ХОБЛ не измеряли скорость экспираторного потока, однако тяжесть заболевания у больных ХОБЛ сказывается на скорости экспираторного потока, изменения которого могут менять концентрации некоторых биомаркеров. Напро-

тив, паттерн дыхания значимо не влияет на концентрацию лейкотриенов (ЛТ)  $E_4$ ,  $E_4$ , простагландина (ПГ)  $E_2$ , альдегидов, pH,  $NO_3^-$  и общего белка [10, 35, 48].

Проведенные ранее исследования показали, что минутная вентиляция не влияет на химический состав КВВ. В настоящий момент нет исследований, свидетельствующих о влиянии задержки дыхания на концентрацию биомаркеров в КВВ. Также нет данных о возможном влиянии кашля (как произвольного, так и индуцированного) на состав КВВ.

Объем КВВ не зависит от функциональных показателей легких, включая **объем форсированного выдоха за 1-ю секунду** (ОФВ<sub>1</sub>) и форсированную жизненную емкость легких, у здоровых субъектов и больных ХОБЛ [21]. В настоящее время нет данных, указывающих на изменение концентрации медиаторов в КВВ при изменении калибра дыхательных путей. Имеются результаты, свидетельствующие об отсутствии зависимости между уровнем pH КВВ и степенью бронхиальной обструкции, индуцированной при проведении теста с метахолином [48].

В исследовании, включавшем более 400 здоровых субъектов, не наблюдалось различий в уровне pH КВВ в зависимости от возраста, пола или расы [41]. Масса тела и рост больных ХОБЛ не влияют на объем КВВ и концентрацию пероксида водорода в нем [21]. Однако концентрация пероксида водорода в КВВ повышается с возрастом [16]. Нет данных о потенциальном влиянии расы, пола и положения тела во время сбора КВВ на содержание различных медиаторов.

При сравнении уровня pH при разных временных интервалах не было выявлено влияния времени сбора КВВ на значение pH. Также не обнаружено различия между концентрациями пероксида водорода, нитратов/нитритов, 8-изопростана, аденозина и малондальдегида при сборе КВВ в течение 10, 15 и 20 мин [16].

G.E. Caragnano et al. отметили значимое повышение концентрации **интерлейкина-6** (ИЛ-6) и **фактора некроза опухоли  $\alpha$**  (ФНО- $\alpha$ ) в КВВ и снижение уровня pH после индуцирования мокроты гипертоническим раствором по сравнению с физиологическим [6]. Другие исследователи обнаружили повышение уровня ЛТВ<sub>4</sub> и 8-изопростана в КВВ, полученном после индуцирования мокроты, у здоровых добровольцев, чего не отмечалось у больных **бронхиальной астмой** (БА) [3]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что КВВ следует собирать перед индуцированием мокроты.

У здоровых субъектов курение сигарет вызывает повышение уровня пероксида водорода, 8-изопростана и изменение хемотаксической активности нейтрофилов, но без изменения концентрации ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  [19, 36]. У больных ХОБЛ курение приводит к резкому повышению в КВВ содержания 8-изопростана и пероксида водорода, которые являются маркерами окислительного стресса [33].

Курение также значимо влияет на уровень нитритов и нитротирозина в КВВ [16]. В. Valint et al. показали, что уровень метаболитов NO – нитритов/нитратов ( $NO_2^-/NO_3^-$ ) был существенно повышен в течение 30 мин после курения двух сигарет и возвращался к исходному значению спустя 90 мин. Напротив, концентрации  $NO_3^-$ , S-нитрозотиолов и

нитротирозина в КВВ не изменялись [3, 16]. Другие авторы не обнаружили различий в уровне  $\text{NO}_3^-$ , ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , общего белка и альдегида после курения одной сигареты [10, 19]. В связи с возможным влиянием сигаретного дыма на содержание медиаторов рекомендуется воздержаться от курения в течение 3 ч перед сбором КВВ.

Большинство медиаторов, обнаруживаемых в КВВ, содержатся в ультранизких концентрациях, а измеряемые значения имеют большую вариабельность. Потенциальным решением данной проблемы является концентрирование образцов, которое позволяет повысить чувствительность и воспроизводимость метода [13, 34]. С этой целью некоторые исследователи применяли лиофилизацию, ре-супензирования и вакуумное испарение [3, 16].

Из-за разницы характеристик большинства медиаторов не представляется возможным измерить их уровень непосредственно после сбора КВВ, за исключением рН и пероксида водорода [4, 48]. Образцы КВВ должны быть заморожены сразу после сбора и храниться при температуре  $-70^\circ\text{C}$  до проведения анализов. Если планируются измерения более одного медиатора, то образцы следует собирать в разные пробирки, для того чтобы избежать последующих циклов замораживания–размораживания, которые могут разрушить медиаторы (например, ПГ, ЛТ и пероксид водорода). Даже при таких условиях хранения некоторые медиаторы при длительном хранении нестабильны. Например, известно, что уровень пероксида водорода снижается в течение нескольких дней. В то же время существуют данные о том, что рН сохраняет стабильность в течение 2 лет хранения. Цистеиновые ЛТ также являются нестабильными компонентами в большинстве биологических жидкостей, хотя данные об их стабильности в КВВ отсутствуют [16]. Не обнаружено влияния замораживания на срок до 2 мес на уровни рН, 8-изопростана,  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , пероксида водорода, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  в КВВ.

### Методы анализа КВВ

**Иммуноферментный твердофазный анализ** (ИФА, ELISA) является распространенным методом для измерения содержания медиаторов воспаления в КВВ. Метод легко выполнить, относительно недорог, проведенные исследования показали хорошую воспроизводимость результатов [20, 36, 38]. Однако, несмотря на использование идентичных наборов для ИФА в одинаковых группах пациентов, концентрации биомаркеров в разных исследованиях различались [2, 38].

Специфичность метода **ELISA** для ЛТВ<sub>4</sub> и 8-изопростана была подтверждена с использованием обратнофазовой **высокоэффективной жидкостной хроматографии** (ВЭЖХ). Использование **масс-спектрометрии** (МС) может обеспечить более точный количественный анализ присутствующих в КВВ соединений. Сочетание газовой хроматографии или жидкостной хроматографии и МС предполагает высокую чувствительность для анализа КВВ. Хотя эти методы являются более дорогостоящими и трудоемкими, чем ELISA, они могут быть использованы для более точного анализа состава КВВ [3, 34].

В последние годы для определения профиля низкомолекулярных метаболитов в КВВ используется **метаболом-**

**ный анализ**, основанный на ядерно-магнитном резонансе высокого разрешения, или ВЭЖХ-МС [3, 13]. Сигналы, полученные во время анализа, позволяют дифференцировать здоровых субъектов от больных БА. Этот метод является перспективным для разработки гипотез по определению новых метаболических путей, которые помогут в идентификации новых биомаркеров ХОБЛ.

У больных ХОБЛ сбор КВВ проводят с тремя целями:

- 1) исследование патологических механизмов дыхательных путей посредством изучения изменений уровня медиаторов;
- 2) более тщательное изучение состава жидкости, покрывающей эпителиальный слой дыхательных путей;
- 3) использование значений уровня медиаторов в качестве биомаркеров ХОБЛ.

### Использование биомаркеров КВВ при ХОБЛ

Результаты исследований специфических биомаркеров КВВ при фенотипировании ХОБЛ, мониторинге обострения и оценке эффективности терапевтических вмешательств суммированы в таблице.

#### рН

Гомеостаз дыхательных путей зависит от баланса различных буферных систем, продукции и высвобождения кислот и оснований в дыхательные пути. Предполагают, что окислительный процесс в дыхательных путях и его регуляция вовлечены в патогенез обструктивных болезней легких. Потенциальный механизм заключается в том, что протоны вызывают высвобождение тахикининов, способствующих бронхоспазму и воспалению дыхательных путей.

В отличие от других медиаторов КВВ уровень рН у больных ХОБЛ может варьировать в широких пределах [4, 29, 41]. Более высокая вариабельность рН КВВ у больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми, вероятнее всего, связана с различным уровнем рН в дыхательных путях [48]. Механизмы, которые способствуют окислительному процессу в дыхательных путях и его вариабельности при ХОБЛ, не ясны.

Было зарегистрировано снижение показателей рН при обострении ХОБЛ [4, 17, 29]. К. Kostikas et al. обнаружили, что уровень рН КВВ коррелирует с эозинофильным и нейтрофильным воспалением дыхательных путей и легочной функцией, хотя в других исследованиях у больных ХОБЛ связь ОФВ<sub>1</sub> с уровнем рН не подтверждена [1, 4, 29].

В наблюдательном исследовании, включавшем больных с обострением БА, было показано, что уровень рН КВВ повышается при лечении ГКС [1, 3, 17]. Это позволяет предположить, что рН КВВ может быть чувствительным маркером при оценке эффективности лечения.

#### Пероксид водорода

Пероксид водорода продуцируется различными клетками дыхательных путей, включая нейтрофилы, эозинофилы, макрофаги и эпителиальные клетки, при реакции супероксиданиона  $\text{O}_2^-$ , опосредованной супероксиддисмута-

Данные исследований по анализу биомаркеров в КВВ у больных ХОБЛ

Биомаркеры	ХОБЛ		Эффект курения	Эффект лечения
	ремиссия	обострение		
pH	↓ [4]	↓ [4, 29]	–	Ингаляционные ГКС ↔ [29]
Метаболиты NO	↓ NO <sub>x</sub> [23] ↑ нитриты [8] ↑ S-нитрозотиолы [8]	–	↑ NO <sub>x</sub> [16] ↔ NO <sub>x</sub> [23]	Ингаляционные ГКС ↔ NO <sub>x</sub> [23]
Простаноиды	↑ ПГЕ <sub>2</sub> , ПГF <sub>2α</sub> [38]	–	–	Неселективные ингибиторы ЦОГ ↓ ПГЕ <sub>2</sub> [39] Ингаляционные ГКС ↔ ПГЕ <sub>2</sub> [38]
Лейкотриены	↑ ЛТВ <sub>4</sub> [2, 32, 38]	↑ ЛТВ <sub>4</sub> [2]	–	Неселективные ингибиторы ЦОГ ↑ ЛТВ <sub>4</sub> [39] Антибиотики ↓ ЛТВ <sub>4</sub> [2] Ингаляционные ГКС ↔ ЛТВ <sub>4</sub> [38]
8-изопростан	↑ [25, 30, 36]	↑ [2, 25, 30]	↔ [36]	Антибиотики ↓ [2] Ингаляционные ГКС ↔ [3]
Пероксид водорода	↑ [30, 40]	↑ [11, 40, 47]	↑ [36] ↔ [40]	Ингаляционные ГКС ↔ [14], ↓ [47] N-ацетилцистеин ↓ [24]
Цитокины	↑ ИЛ-1β, ИЛ-12, ФНО-α [6, 7]	↑ ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-1β, ФНО-α [6, 22, 26]	↔ ИЛ-1β, ФНО-α [19]	–

Обозначения: ↑ – повышение, ↓ – снижение, ↔ – без изменений. ЦОГ – циклооксигеназа.

зой. Пероксид водорода является летучей молекулой, что было продемонстрировано при анализе КВВ [16].

Концентрация пероксида водорода в КВВ повышалась у здоровых курильщиков и больных ХОБЛ, но различия между группами были недостоверными [30, 40]. У пациентов с обострением ХОБЛ обнаружены более высокие показатели, чем при стабильном течении заболевания [11, 14, 47]. Длительное лечение муколитическим антиоксидантом N-ацетилцистеином вызывало снижение концентрации пероксида водорода в КВВ у больных ХОБЛ [24]. Также было выявлено, что ингаляции беклометазона и флутиказона пропионата снижают уровень пероксида водорода в КВВ через 4 нед лечения, в то время как содержание пероксида водорода в КВВ не изменилось после 2 нед лечения беклометазоном по сравнению с плацебо в перекрестном исследовании у больных ХОБЛ [14, 47].

Обнаружены корреляции между уровнем пероксида водорода в КВВ и значением ОФВ<sub>1</sub>, числом нейтрофилов в мокроте и тяжестью одышки, указывающие на то, что этот медиатор отражает активность воспалительного процесса [16]. Следовательно, измерение уровня пероксида водорода в КВВ можно использовать для оценки эффективности лечения при ХОБЛ.

### Оксид азота и его продукты

Оксид азота – высокореактивный свободный радикал, конечными стабильными продуктами которого являются NO<sub>2</sub> и NO<sub>3</sub> (NO<sub>x</sub>). При окислительном стрессе в результате реакции между NO и супероксиданионом в дыхательных путях образуется пероксинитрит – мощный оксидант. Последний, в свою очередь, реагирует с тирозином, образуя

стабильный продукт нитротирозин, который может быть определен при помощи специфических антител. Метаболиты NO можно выявить в ALF респираторного тракта человека [3, 45].

Газообразный NO взаимодействует с ALF, приводя к повышению в ней содержания NO<sub>x</sub> [3]. В проведенных исследованиях у курильщиков с нормальной функцией легких и у здоровых некурящих лиц наблюдались как повышенные, так и нормальные уровни NO<sub>x</sub> [3, 8, 9, 19]. Более высокие уровни NO<sub>2</sub> и NO<sub>3</sub> обнаружены в КВВ у больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими и некурящими субъектами [9]. Это указывает на высокий нитративный стресс в дыхательных путях у пациентов с ХОБЛ. С. Gessner et al. выявили сильную взаимосвязь между

концентрацией NO<sub>3</sub> в КВВ и гиперинфляцией легких при ХОБЛ [23]. При бронхитическом типе ХОБЛ, при котором продукция слизи может приводить к уменьшению уровня выдыхаемого NO, измерение концентрации NO<sub>x</sub> в КВВ может иметь преимущества [38].

Определение выдыхаемого NO широко используется для оценки эффективности лечения ингаляционными ГКС у пациентов с БА, а также у бывших курильщиков с ХОБЛ [14]. У больных БА будесонид вызывал значительное снижение уровня NO<sub>x</sub> в КВВ по сравнению с показателем при использовании плацебо [3]. Потенциал использования анализа NO<sub>x</sub> в КВВ в качестве биомаркера эффективности лечения должен быть дополнительно изучен при ХОБЛ, в том числе у бывших курильщиков. Отсутствуют исследования по определению нитротирозина в КВВ при ХОБЛ.

Нитрозотиолы (RS-NOs) формируются при взаимодействии NO или NO<sub>2</sub> с глутатионом или другими тиолсодержащими соединениями. M. Corradi et al. обнаружили достоверное повышение концентрации нитрозотиолов в КВВ у курящих субъектов по сравнению с некурящими. Они также выявили достоверно более высокий уровень нитрозотиолов в КВВ у бывших курильщиков с ХОБЛ по сравнению со здоровыми некурящими субъектами [8].

### Метаболиты арахидоновой кислоты

Арахидоновая кислота, высвобождаемая из клеточных мембран посредством фосфолипазы A<sub>2</sub>, превращается в простагландиновые эндопероксиды при помощи **циклооксигеназы** (ЦОГ). Эндопероксиды затем превращаются в простагландины, простаглицлин и **тромбоксан A<sub>2</sub>** (TxA<sub>2</sub>)

[16]. Тромбоксан  $A_2$  быстро превращается в  $TxB_2$  – химически стабильный, но биологически неактивный метаболит (в дальнейшем  $TxB_2$  подвергается  $\beta$ -окислению, в результате образуется 2,3-динор- $TxB_2$ ). Поэтому синтез тромбоксана в биологических тканях можно мониторировать с помощью измерения уровня  $TxB_2$ .

### Простагландины

Не было обнаружено значимой разницы между содержанием выдыхаемых  $PGE_2$ ,  $PGD_2$  и  $TxB_2$  у здоровых и больных БА, тогда как концентрация  $PGE_2$  в КВВ была повышена у больных ХОБЛ и курящих пациентов с БА [31, 38]. И наоборот, уровень  $TxB_2$  увеличен в КВВ при БА, но у больных ХОБЛ  $TxB_2$  не определяется [35, 38]. Эти наблюдения показывают, что профиль простагландинов в КВВ при указанных заболеваниях может различаться.

Было выявлено, что у больных ХОБЛ ибупрофен в отличие от рофекоксиба (ингибитора ЦОГ-2) значительно снижает содержание  $PGE_2$  в КВВ по сравнению с плацебо. Это показывает, что с помощью данного биомаркера можно с высокой чувствительностью различать селективное и неселективное подавление ЦОГ у больных ХОБЛ [39]. Для правильной оценки возможностей определения  $PGE_2$  в КВВ в качестве биомаркера эффективности терапии ингибиторами ЦОГ необходимы дополнительные исследования.

### Лейкотриены

Лейкотриен  $V_4$  – продукт метаболизма арахидоновой кислоты по 5-липоксигеназному пути – потенциальный хемотаксисный нейтрофилов, который играет важную роль в патогенезе ХОБЛ. Цистеиновые ЛТ ( $LT_{C_4}$ ,  $LT_{D_4}$ ,  $LT_{E_4}$ ) высвобождаются из воспалительных клеток, частично из эозинофилов и тучных клеток и играют определенную роль в воспалении дыхательных путей при БА.

Повышение уровня  $LT_{V_4}$  в КВВ было продемонстрировано у больных с обострением и со стабильным течением ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками, а также у здоровых курильщиков по сравнению с некурящими [2, 7, 28, 38, 43]. Эти исследования позволяют предположить, что анализ  $LT_{V_4}$  в КВВ может быть использован для диагностики ХОБЛ.

Не было различий в уровне  $LT_{V_4}$  в КВВ в группах больных ХОБЛ, получавших и не получавших ГКС, что, однако, не позволяет окончательно исключить влияние ГКС на уровень  $LT_{V_4}$ . При ХОБЛ уровень  $LT_{V_4}$  в КВВ был повышен в фазе ремиссии, в дальнейшем повышался при обострении заболевания и снижался после антибактериальной терапии [43]. Это дает возможность предположить, что  $LT_{V_4}$  является индикатором тяжести воспаления в дыхательных путях. Концентрация  $LT_{V_4}$  в КВВ у больных ХОБЛ коррелирует с нейтрофилезом мокроты и может быть полезным маркером степени нейтрофильного воспаления [28].

Потенциал  $LT_{V_4}$  в качестве биомаркера ХОБЛ был изучен в рандомизированном плацебоконтролируемом исследовании эффективности ибупрофена и открытом неконтролируемом исследовании эффективности рофе-

коксиба [39]. Поскольку ибупрофен в отличие от рофекоксиба вызывал значимое повышение уровня  $LT_{V_4}$  в КВВ, с помощью рофекоксиба можно с высокой чувствительностью различать селективное и неселективное подавление ЦОГ у больных ХОБЛ.

### 8-изопростан

8-изопростан является стабильным простагландиноподобным продуктом, который синтезируется из арахидоновой кислоты под действием активных форм кислорода и поэтому позиционируется как маркер оксидативной активности и окислительного стресса. Концентрация 8-изопростана в КВВ была повышена у больных с ремиссией ХОБЛ по сравнению с таковой у здоровых некурящих субъектов [30, 36]. Также уровень 8-изопростана в КВВ был повышен у здоровых курильщиков и пациентов с обострением ХОБЛ, после лечения его концентрация снижалась [2, 30, 36].

Не наблюдалось корреляций между уровнем 8-изопростана и значением  $OFV_1$ , стажем курения, клеточным составом мокроты и тяжестью одышки у больных ХОБЛ [30, 36]. Однако F.W. Ko et al. обнаружили значимо более высокие концентрации 8-изопростана в КВВ у больных с тяжелой ХОБЛ, чем у пациентов с легким и среднетяжелым течением заболевания [25].

При БА повышение уровня 8-изопростана в КВВ также коррелировало с тяжестью заболевания [37]. Не обнаружено снижения концентрации этого биомаркера у пациентов с БА, получающих ингаляционные ГКС [3]. Повышение уровня 8-изопростана и при ХОБЛ, и при БА свидетельствует о том, что он не является болезнью-специфическим маркером окислительного стресса.

### Другие маркеры окислительного стресса

**Альдегиды** (малондиальдегид, 4-гидроксигексаналь, 4-гидроксиноненаль, гексаналь, гептаналь и нонаналь) являются продуктами перекисного окисления липидов и указывают на оксидант-индуцированное повреждение легких [21]. Предполагается, что восстановленный глутатион отражает антиоксидантную способность [16].

Содержание **гексаналя** и **гептаналя** в КВВ было повышено у больных со стабильным течением ХОБЛ по сравнению с показателем некурящих лиц контроля. Было показано, что концентрация **малондиальдегида** в КВВ у пациентов с ХОБЛ повышена по сравнению со здоровыми курильщиками, а у курильщиков по сравнению с некурящими субъектами [10].

Измерение содержания продуктов **тиобарбитуровой кислоты** является простым, но неспецифическим методом оценки перекисного окисления липидов и не рекомендовано в качестве маркера перекисного окисления липидов [40].

У больных с обострением БА было обнаружено повышение концентрации альдегида и снижение содержания **глутатиона** в КВВ, после проведенного лечения их значения возвращались к уровню здоровых людей [16]. Концентрация альдегидов в КВВ также была повышена при ХОБЛ [10].

**Цитокины**

Клетки воспаления и структурные клетки респираторной системы способны синтезировать различные цитокины [22]. С помощью метода ИФА было обнаружено повышение концентрации ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  (провоспалительных цитокинов) и ИЛ-10 (регуляторного цитокина) в КВВ у здоровых курильщиков и больных ХОБЛ [6, 7]. K.W. Garey et al. выявили более высокий уровень общего белка в КВВ у курильщиков и больных ХОБЛ, чем у некурящих людей, но не отметили различий в концентрациях ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ . У молодых курильщиков в КВВ также обнаружено повышение уровня ИЛ-1 $\beta$  [19].

У здоровых курильщиков выявлены корреляции между содержанием ИЛ-6 в КВВ и стажем курения, а также значением ОФВ<sub>1</sub> [7]. В недавно проведенном исследовании с использованием мультиплексного анализа было обнаружено повышение уровня цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12p70 и ФНО- $\alpha$ ) в КВВ у больных с обострением ХОБЛ по сравнению с показателями у стабильных пациентов [22]. Это исследование показывает, что цитокины КВВ могут быть полезными биомаркерами при оценке обострений ХОБЛ.

**Другие молекулы/вещества**

Конденсат выдыхаемого воздуха также содержит молекулы, включая среднелетучие липидные медиаторы,  $\alpha_1$ -антитрипсин, эритропоэтин, различные протеины, ДНК, витронектин, эндотелин-1, токсические металлы, микроэлементы, аденозин и другие маркеры, которые дают важную информацию о патогенезе ХОБЛ [3, 16, 27, 34].

Таким образом, КВВ содержит множество биомаркеров в ультранизких концентрациях. С развитием более чувствительных методов анализа КВВ с использованием биосенсоров (для определения различных липидных медиаторов в режиме он-лайн), технологий метабономики (для обнаружения сотен тысяч метаболитов) и протеомиков (для определения белковых соединений) могут быть выявлены специфичные биомаркеры ХОБЛ. Сбор КВВ может быть полезным для быстрого определения инфекционного процесса в легких с помощью технологии полимеразной цепной реакции. Исследование КВВ может доказать свою пользу в скрининге легочных заболеваний, мониторинге течения заболевания и прогнозировании эффекта от проводимого лечения. Анализ КВВ встанет в один ряд с другими методами и позволит решить ряд проблем медицины, связанных с патофизиологией ХОБЛ и других заболеваний респираторного тракта.

**Список литературы**

1. Antus B. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2010. V. 182. № 12. P. 1492.

2. Biernacki W.A. et al. // Thorax. 2003. V. 58. P. 294.  
 3. Borrill Z.L. et al. // Eur. Respir. J. 2008. V. 32. № 2. P. 472.  
 4. Borrill Z. et al. // Eur. Respir. J. 2005. V. 25. P. 269.  
 5. Brightling C.E. et al. // Thorax. 2005. V. 60. P. 193.  
 6. Carpagnano G.E. et al. // Chest. 2005. V. 128. P. 3159.  
 7. Carpagnano G.E. et al. // Eur. Respir. J. 2003. V. 21. P. 589.  
 8. Corradi M. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. V. 163. P. 854.  
 9. Corradi M. et al. // Nitric Oxide. 2003. V. 8. P. 26.  
 10. Corradi M. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003. V. 167. P. 1380.  
 11. Dekhuijzen P.N. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996. V. 154. P. 813.  
 12. Donaldson G.C. et al. // Chest. 2005. V. 128. P. 1995.  
 13. Fens N. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2009. V. 180. № 11. P. 1076.  
 14. Ferreira I.M. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. V. 164. P. 1012.  
 15. Hoffmeyer F. et al. // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2009. V. 9. № 1. P. 16.  
 16. Horvath I. et al. // Eur. Respir. J. 2005. V. 26. P. 523.  
 17. Hunt J.F. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000. V. 161. P. 694.  
 18. Hurst J.R. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006. V. 174. P. 867.  
 19. Garey K.W. et al. // Chest. 2004. V. 125. P. 22.  
 20. Gerritsen W.B. et al. // Respir. Med. 2005. V. 99. P. 84.  
 21. Gessner C. et al. // Pneumologie. 2001. V. 55. P. 414.  
 22. Gessner C. et al. // Respir. Med. 2005. V. 99. P. 1229.  
 23. Grob N.M. et al. // J. Breath Res. 2008. V. 2. № 3. P. 037004.  
 24. Kasielski M., Nowak D. // Respir. Med. 2001. V. 95. P. 448.  
 25. Ko F.W. et al. // Respir. Med. 2006. V. 100. P. 630.  
 26. Ko F.W. et al. // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 2009. V. 4. P. 79.  
 27. Koczulla A.R. et al. // Respir. Med. 2012. V. 106. № 1. P. 120.  
 28. Kostikas K. et al. // Chest. 2005. V. 127. P. 1553.  
 29. Kostikas K. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002. V. 165. P. 1364.  
 30. Kostikas K. et al. // Chest. 2003. V. 124. P. 1373.  
 31. Kostikas K. et al. // Eur. Respir. J. 2003. V. 22. P. 743.  
 32. Leigh R. et al. // Eur. Respir. J. 2006. V. 27. P. 964.  
 33. Lee W., Thomas P.S. // Clin. Transl. Sci. 2009. V. 2. № 2. P. 150.  
 34. Lin J.L. et al. // Expert Rev. Proteomics. 2010. V. 7. № 3. P. 361.  
 35. Montuschi P., Barnes P.J. // J. Allergy Clin. Immunol. 2002. V. 109. P. 615.  
 36. Montuschi P. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000. V. 162. P. 1175.  
 37. Montuschi P. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999. V. 160. P. 216.  
 38. Montuschi P. et al. // Thorax. 2003. V. 58. P. 585.  
 39. Montuschi P. et al. // Thorax. 2005. V. 60. P. 827.  
 40. Nowak D. et al. // Respir. Med. 1999. V. 93. P. 389.  
 41. Paget-Brown A.O. et al. // Chest. 2006. V. 129. P. 426.  
 42. Papaioannou A.I. et al. // Respir. Med. 2010. V. 104. № 2. P. 275.  
 43. Papi A. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006. V. 173. P. 1114.  
 44. Popov T.A. // Ann. Allergy Asthma Immunol. 2011. V. 106. № 6. P. 451.  
 45. Ricciardolo F.L. et al. // Eur. J. Pharmacol. 2006. V. 533. P. 240.  
 46. Taylor D.R. // J. Allergy Clin. Immunol. 2011. V. 128. № 5. P. 927.  
 47. van Beurden W.J. et al. // Respiration. 2003. V. 70. P. 242.  
 48. Vaughan J. et al. // Eur. Respir. J. 2003. V. 22. P. 889.  
 49. Wadsworth S. et al. // J. Asthma Allergy. 2011. V. 4. P. 77. ●