

УДК 616.24:616.15

НОВЫЙ СПОСОБ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ АНТИПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТЕИНОГРАММЫ У БОЛЬНЫХ ХОБЛ, БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, ПНЕВМОНИЕЙ

© Ю.Р. Агапова, А.В. Гулин

Ключевые слова: обострение ХОБЛ; бронхиальная астма; пневмония; белковые фракции; сыворотка крови; протеазный дисбаланс; вторичный иммунодефицит; прогноз.

Изучали белковые фракции сыворотки крови методом электрофореза у пациентов с обострением хронической обструктивной болезни, бронхиальной астмы и с пневмонией. Был предложен новый способ предварительной оценки состояния гуморального иммунитета и антипротеазной активности сыворотки, включающий анализ долей фракций α_2 - и γ -глобулинов. Неблагоприятными прогностическими признаками рекомендовано считать низкие значения γ -фракции (для астмы и ХОБЛ) и соответствующие нижним границам нормы и меньше показатели фракции α_2 -глобулинов (для ХОБЛ), что, по мнению авторов, требует особого индивидуального подхода к лечению и реабилитации.

Определение белка и белковых фракций у больных с различной патологией имеет особое значение, прежде всего, для оценки активности воспалительного процесса. Традиционно в лабораториях пользуются методом электрофореза. Данная методика хорошо известна еще с прошлого столетия и широко распространена в медицинских учреждениях. Стандарты оказания помощи пульмонологическим больным версии 2007 г. диктуют нам необходимость и информативность подобного исследования¹, а достаточно низкокзатратная технология делает результаты доступными для специалистов любого уровня. Способ определения унифицирован и достаточно точен в отличие от качественных и полуквантитативных методов [1].

Концентрация белков в плазме здорового человека колеблется от 65 до 85 г/л. Основная часть общего белка плазмы крови (около 90 %) приходится на альбумины, глобулины и фибриноген. Альбумины – относительно гомогенная фракция простых белков, синтезирующихся в печени, выполняющих транспортную функцию и создающих онкотическое давление в плазме крови. Более «тяжелых» белков глобулинов четыре фракции. Альфа-1(α_1)-глобулины включают α_1 -анти трипсин и α_1 -гликопротеид, переносчик половых гормонов. Большую долю альфа-2(α_2)-глобулинов составляет α_2 -макроглобулин (α_2 МГ) – ингибитор ряда протеолитических ферментов (трипсина, химотрипсина, тромбина, плазмина, калликреина), синтезирующийся вне печени. В меньшей степени во фракцию включены: гаптоглобин – белок, связывающий и транспортирующий свободный гемоглобин А в клетки ретикулоэндотелиальной системы; церулоплазмин, обладающий оксидантной активностью и окисляющий двухвалентное железо в трехвалентное, что обеспечивает его транспорт трансферрином; апопротеиды А, В и С, входящие в

состав липопротеидов. Ну и наконец, гамма(γ)-глобулины наделены функцией антител и вырабатываются в ответ на внедрение в организм чужеродных агентов [2–3].

Следует подчеркнуть, что в разных клинических лабораториях, использующих различные автоматические анализаторы и методы определения белковых фракций, нормативы могут несколько отличаться, например, в зависимости от способа окраски материала (табл. 1) [4].

Изменение содержания фракций глобулинов характерно для любого острого или хронического воспаления. Чаще всего наблюдается увеличение содержания α_1 и α_2 -фракций. Это связано с тем, что в состав α -глобулинов входят т. н. белки острой фазы, закономерно увеличивающиеся при любом воспалительном процессе в организме. Кроме того, увеличение содержания α -глобулинов типично при повреждении и распаде тканей (дистрофические, некротические процессы), сопровождаемом деструкцией клеток и высвобождением тканевых протеаз, калликреина, тромбина, плазмина и т. д., что закономерно приводит к увеличению содержания их естественных ингибиторов (α_1 -анти трипсина, α_1 -гликопротеида, α_2 -макроглобулина и др.). Повреждение тканей приводит также к высвобождению патологического С-реактивного белка, являющегося продуктом распада клеток и входящего в состав α_1 -фракции глобулинов. Увеличение фракции β -глобулинов обычно наблюдается при острых и хронических заболеваниях, сопровождающихся увеличением содержания в крови иммуноглобулинов (обычно параллельно с увеличением содержания γ -глобулинов), в т. ч. при инфекциях, хронических воспалительных процессах в бронхах, болезнях соединительной ткани, злокачественных новообразованиях, аутоиммунных и аллергических заболеваниях.

Широко известно, что и при пневмонии, и при ХОБЛ, и при бронхиальной астме имеет место воспалительная реакция в системе дыхания, однако в первом

¹ Приказ Министерства здравоохранения и соцразвития РФ от 11.05.2007 г. № 327 «Стандарт медицинской помощи больным с хронической обструктивной болезнью легких...».

Таблица 1

Нормативы белковых фракций сыворотки крови

Белковые фракции	Электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы		Электрофорез на бумаге
	Окраска		
	Пунцовый С	Бромфеноловый синий	
Альбумин, г/л	52 (46,9–61,4)	58 (53,9–62,1)	50–70
α 1-глобулины, %	3,3 (2,2–4,2)	3,9 (2,7–5,1)	3–6
α 2-глобулины, %	9,4 (7,9–10,9)	8,8 (7,4–10,2)	9–15
β -глобулины, %	14,3 (10,2–18,3)	13,0 (11,7–15,3)	8–18
γ -глобулины, %	21,4 (17,6–25,4)	18,5 (15,6–21,4)	15–25

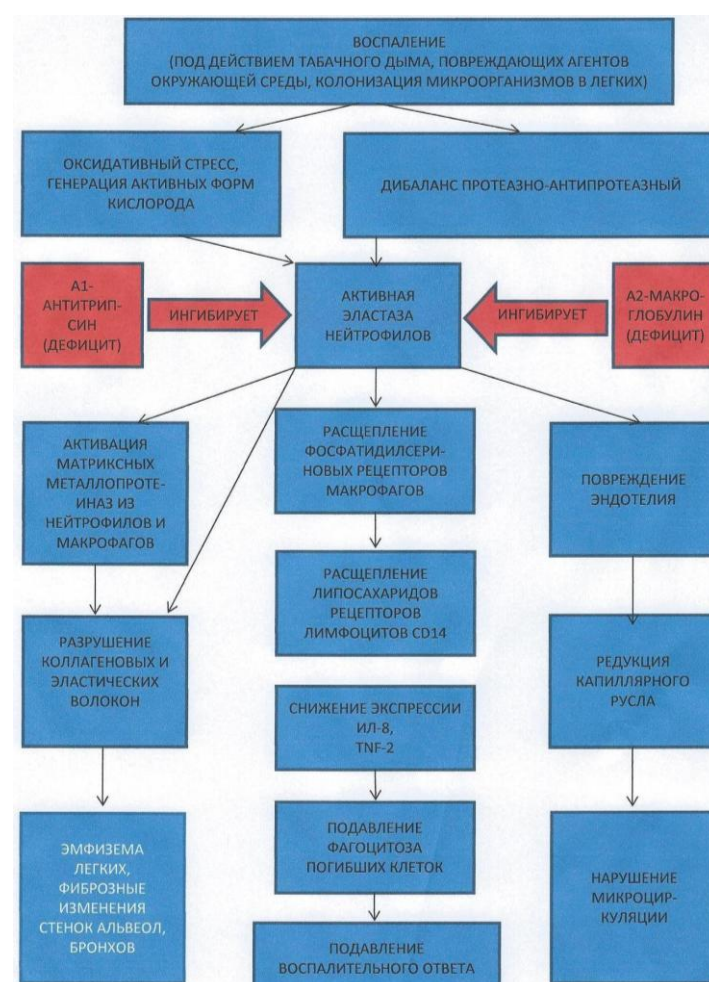


Рис. 1. Схема протеазной агрессии в патогенезе ХОБЛ с участием эластазы нейтрофилов

случае процесс начинается остро и его локализация – это дистальные отделы (альвеолы), а во втором и третьем случаях воспаление хроническое, персистирующее, локализуется проксимальнее, а в финале задействованы все компоненты легочной ткани. Отличается и исход: при пневмонии чаще благоприятный и подразумевает выздоровление с разрешением воспаления, восстановлением инфильтрированной зоны; астма – хроническое заболевание, и характер течения зависит от реактивности организма и степени медикаментозного контроля [5]; при ХОБЛ неизбежно прогрессивное течение, прогрессирует пневмофиброз, эмфизема, про-

исходит ремоделирование бронхов, сосудов в сочетании с потерей дыхательных объемов [6]. В патогенезе ХОБЛ выделяют три ведущих составляющих: хроническое воспаление, дисбаланс в системе протеолиз – антипротеолиз (рис. 1) и оксидативный стресс [7–9]. Для астмы протеазная активность также описана [10], но отличительной особенностью является отсутствие дефицита α 2-МГ в сыворотке крови, так характерного для ХОБЛ. При пневмониях острота воспалительных изменений в легких и риск возникновения деструкции легочной ткани также обусловлены гиперпродукцией и высокой активностью нейтрофильных и бактериальных

протеаз. Однако в острой фазе пневмонии в течение 1-й и 2-й недель наблюдается усиленная выработка α_1 -антитрипсина, способствующего нейтрализации протеазной активности [11]. Поэтому изучение **разности** отражения воспалительной реакции организма на пейзаже сывороточных белковых фракциях при этих заболеваниях безусловно представляет научный интерес.

Цель исследования – провести оценку диагностической и прогностической значимости белковых фракций сыворотки крови у больных с пневмонией, обострением ХОБЛ и бронхиальной астмы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 135 госпитализированных пациентов с обострением ХОБЛ, 45 пациентов с обострением бронхиальной астмы и 50 – с пневмонией. Общими критериями включения пациентов в исследование были возраст старше 30 лет; документированный диагноз ХОБЛ, астмы, наличие признаков обострения данных заболеваний [5–6]. Пневмонии включались в группу только с типичным течением, бактериальной природы, различной степени тяжести. Мужчин с пневмонией было 28 пациентов, женщин – 22, средний возраст – $44 \pm 12,7$ лет. Критериями исключения из исследования были другие хронические и острые заболевания легких, онкопатология, хронический алкоголизм, наркомания, токсикомания, психические заболевания, беременность, заболевания крови, хроническая почечная и печеночная недостаточность, обострения хронических воспалительных заболеваний иной локализации, осложненное течение ИБС, гипертонической болезни в анамнезе, сахарный диабет. В качестве контроля использовались показатели сыворотки крови 25 студентов Липецкого государственного технического университета, возраста 18–20 лет, не имеющих в анамнезе каких-либо хронических заболеваний и добровольно давших письменное согласие на участие в эксперименте. Общая характеристика пациентов с ХОБЛ представлена в табл. 2.

При поступлении все пациенты с ХОБЛ были опрошены на наличие трех критериев Anthonisen, а именно: усиление диспноэ, гиперпродукция и увеличение степени гнойности мокроты [12]. Оценка диспноэ проводилась по русскоязычным версиям шкал диспноэ Borg [13] и MRC². Общая оценка тяжести заболевания проводилась с помощью шкалы APACHE².

Распределение пациентов БА в зависимости от степени тяжести заболевания осуществлялось следующим образом: больных с легким течением астмы в стационаре не было, со средней степенью тяжести – 34 человека (75,5 %), а пациентов, страдающих тяжелой астмой, – 11 (24,5 %) (табл. 3).

Забор венозной крови осуществляли утром натощак на второй день после поступления в стационар. Белковые фракции сыворотки крови определяли методом электрофореза на ацетатцеллюлозе с последующим фотометрическим определением белковых фракций с использованием устройства электрофореза сыворотки крови УЭР-01-«Астра» [4].

² Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 2.07.2007 г. № 459 «Стандарт медицинской помощи больным астмой (при оказании специализированной помощи)».

Таблица 2

Характеристика пациентов с ХОБЛ

Параметры	Значения
Пол, м/ж	70/45
Средний возраст, лет	$63,7 \pm 19,4$
ИМТ, кг/м ²	$26,7 \pm 8,4$
Индекс коморбидности Charlson, баллы	$6,01 \pm 1,34$
Индекс курения, пачек/лет	$34,8 \pm 12,9$
Длительность ХОБЛ, лет	$8,5 \pm 5,3$
Стадии ХОБЛ (GOLD), n (%)	
I	12 (8,9)
II	42 (31,1)
III	69 (51,1)
IV	12 (8,9)
Частота обострений в год	$2,2 \pm 0,8$
Одышка по шкале Borg, баллы	$6,8 \pm 1,8$

Таблица 3

Характеристика пациентов с бронхиальной астмой

Параметры	Значения
Пол, м/ж	14/31
Средний возраст, лет	$54,3 \pm 12,6$
ИМТ, кг/м ²	$31,2 \pm 7,9$
Длительность астмы, лет	$8,7 \pm 3,3$
Частота обострений в год	$1,4 \pm 0,6$
Одышка по шкале Borg, баллы	$4,1 \pm 1,2$

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с определением средних значений полученных показателей (M) и стандартных отклонений ($\pm\sigma$). Доверительный интервал >95 % принимался как статистически значимый. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значимые различия наблюдались относительно фракции α_2 -глобулинов у пациентов с пневмонией и обострением ХОБЛ (табл. 4 и рис. 2). У больных с бронхиальной астмой достоверных различий с контрольной группой обнаружено не было, хотя важно отметить, что из группы пациентов с астмой были умышленно исключены пациенты с сопутствующим обострившимся бронхитом. Это было связано с тем, что доля α_2 -фракции у данной подгруппы (13,1 %) достоверно не отличалась от цифр групп ХОБЛ I–II, что, очевидно, было следствием присоединения инфекционной составляющей воспаления (мокрота носила слизисто-гнойный характер, регистрировалась лихорадка, лейкоцитоз и сдвиг влево в общем анализе крови). Однако после купирования обострения у данной подгруппы (дополнительно получали антибиотик) имело место полное восстановление спирометрических показателей, что говорило об обратимости обструкции и отличало подгруппу от группы ХОБЛ.

Таблица 4

Содержание общего белка (г/л) и белковых фракций (%) у пациентов с пневмониями, обострением бронхиальной астмы и ХОБЛ

Показатель	Контроль	Норма	Пневмония	Астма	ХОБЛ I	ХОБЛ II	ХОБЛ III	ХОБЛ IV
Общ. белок	79,3±8,1	66,0–87,0	75,1±6,8	77,4±7,3	71,3±7,9	73,5±6,8	69,8±6,2	72,6±8,3
Альб./Глоб.	1,14±0,09	1,20–2,00	0,77±0,11**	1,3±0,21	1,04±0,09**	1,07±0,17	1,08±0,23	1,21±0,27
Альбумины	58,2±4,3	46,9–61,4	43,8±4,2	56,5±6,1	51,0±4,3	51,7±4,8	51,9±5,3	54,7±5,2
α1	3,9±0,5	2,2–4,2	3,9±0,7	3,8±0,6	3,7±0,4	4,0±0,8	4,3±0,5	4,5±0,9
α2	9,6±1,4	7,9–10,9	12,6±2,2***	10,4±1,1	13,7±2,0***	13,2±1,6***	11,9±1,9***	12,1±2,1***
β	11,9±1,4	10,2–18,3	13,6±1,7	11,4±1,7	12,9±2,3	13,5±1,8	15,1±2,1**	15,0±1,9**
γ	21,4±2,0	17,6–25,4	26,1±3,0***	17,9±2,8***	18,7±1,8***	17,6±1,2***	16,8±3,0***	13,7±3,9***

Примечание: * – достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,05$); ** – достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,01$); *** – достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,001$).

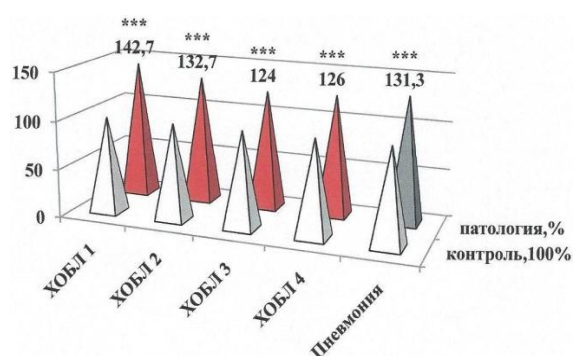


Рис. 2. Содержание (%) фракции α2-глобулинов в сыворотке крови у пациентов с обострением ХОБЛ и пневмонией (относительно контрольных показателей). *** – достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,001$)

У пациентов с ХОБЛ показатели фракции α2-глобулинов превышали контрольные величины на 42,7; 37,5; 24,0 и 26,1 % при ХОБЛ I, II, III, и IV степени, соответственно ($p < 0,001$). При пневмонии средние величины и абсолютные значения фракции α2-глобулинов так же различались с контрольными значениями на 31,6 % ($p < 0,001$), причем по окончании лечения у пациентов с пневмонией осуществляли забор крови повторно и регистрировали нормальные показатели протеинограммы, достоверно не различающиеся с показателями контрольной группы. Учитывая, что большую долю фракции α2-глобулинов составляют антипротеазы, становится очевидным прояснением конфликта системы протеазы – антипротеазы на профиль сывороточных белковых фракций у пациентов с инфекционным процессом в дыхательных путях (обострением бронхита, ХОБЛ и пневмонией). Более того, ведущая роль в абнормальной активности антипротеаз, вероятно, принадлежит α2-МГ, что подтверждают данные Т.С. Овчинниковой [10] об увеличении содержания данного компонента фракции при ХОБЛ. Была отмечена высокая реактивность «защитных сил» на ранних этапах заболевания ХОБЛ и у больных с острой пневмонией и явное снижение защитной активности на пути от ХОБЛ I к ХОБЛ IV, что клинически выразилось в прогрессирующем пневмофиброзе, ремоделировании бронхов и кровеносных сосудов под действием

протеаз (эластазы и др.) в легких. Кроме того, абсолютный рост содержания α2-глобулинов при ХОБЛ I и особенно при пневмониях сказался на соотношении альбуминов к глобулинам в сторону понижения коэффициента на 8,8 и 32,5 % ($p < 0,01$), соответственно, а увеличение доли β-глобулинов на поздних стадиях ХОБЛ носит лишь относительный характер и не выходит за пределы нормативных значений.

Из табл. 2 очевидно, что стадийность заболевания ХОБЛ прослеживается не только по содержанию фракции α2-глобулинов, но и по изменению значений фракции γ-глобулинов. Рис. 3 отображает процентное содержание относительно контроля содержания данной фракции у больных ХОБЛ на разных стадиях и наглядно показывает дефицит иммуноглобулинов, нарастающий по мере снижения респираторной функции в ходе развития заболевания. Возможно, это связано с истощением гуморального иммунитета на фоне усиленного потребления антител при хроническом воспалительном процессе, ведь основной функцией «дефицитных» иммуноглобулинов (антител) является осуществление защиты от бактерий, вирусов и их токсинов как в сыворотке, так и на слизистых, в различных секретах, слюне и в других биологических жидкостях [3]. У больных с пневмонией показатель, наоборот, значимо выше по сравнению с контролем и группой ХОБЛ, что легко объяснить острой воспалительной реакцией организма на фоне бактериальной инфекции в легких.

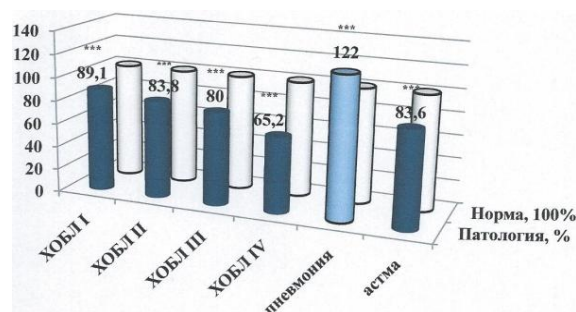


Рис. 3. Содержание (%) фракции γ-глобулинов относительно контрольных величин у пациентов с обострением ХОБЛ и пневмонией. *** – достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,001$)

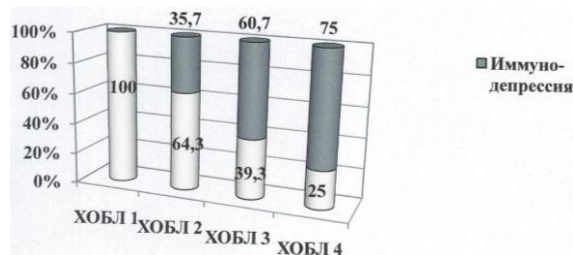


Рис. 4. Процентное соотношение пациентов с ХОБЛ с нормальными и сниженными величинами γ -глобулинов в зависимости от стадии заболевания

Но далеко не у всех пациентов с ХОБЛ были зафиксированы сниженные цифры γ -фракции (по сравнению с контролем и, что важнее, **ниже допустимых норм**). Число подобных случаев в группах значительно нарастало параллельно с прогрессией самого заболевания (рис. 4).

Резюмируя полученные результаты, приходим к выводу, что фракция $\alpha 2$ -глобулинов у пациентов с обострением ХОБЛ и пневмонией отражает высокую антипротеазную активность, имеющую тенденцию к снижению по мере прогрессии ХОБЛ. Защитная реакция антипротеаз направлена на предотвращение пневмофиброза, эмфиземы, ремоделирования бронхов, сосудов, разрушения легочной ткани и на подавление избыточного воспалительного ответа. Наличие превышающих нормативы показателей фракции $\alpha 2$ -глобулинов отражает готовность системы ингибиторов «отразить атаку» протеаз и является прогностически положительным маркером хорошего ответа на традиционную терапию пневмонии или очередного обострения ХОБЛ. Нормальные значения фракции $\alpha 2$ -глобулинов чаще наоборот соответствуют более поздним стадиям заболевания, а слабый ответ на повреждающее действие протеаз только ускорит распространение соединительной ткани в легких и усугубление дыхательной недостаточности. Обнаруженная тенденция также объясняет утяжеление и увеличение частоты обострений с годами у ряда пациентов с ХОБЛ и малую эффективность противовоспалительной и бронходилатационной терапии. Отсутствие подобных изменений в протеинограмме у больных бронхиальной астмой либо свидетельствует о низкой активности $\alpha 2$ -МГ и об ином механизме коррекции протеазной агрессии, либо отражает относительно невысокую активность протеолиза при обострениях. Что касается обнаруженного нарастающего дефицита иммуноглобулинов в сыворотке крови у пациентов с ХОБЛ, это расценили как признак длительного прогрессирующего тяжелого течения заболевания или/и опасного для жизни прогноза. И наоборот, относительная гипергаммаглобулинемия у больных с пневмонией – это признак активизации гуморального звена иммунитета, что является естественной реакцией организма на бактериальную инвазию в альвеолах.

Таким образом, нами предложен новый способ предварительной оценки антипротеазной активности сыворотки и гуморального иммунитета по показателям протеинограммы. Особенно это актуально для пациентов с ХОБЛ и бронхиальной астмой. Для этого рекомендовано оценить долю фракций $\alpha 2$ - и γ -глобулинов в сыворотке крови, что позволит выявить пациентов с

низкими значениями γ -фракции (для астмы и ХОБЛ), с недостаточно «активной» фракцией α -глобулинов (для ХОБЛ), что является неблагоприятным прогностическим признаком и, возможно, потребует особого индивидуального подхода к лечению и к программе реабилитации. Повышение значений $\alpha 2$ -глобулинов при обострении астмы (только в совокупности с клиникой и результатами обследования) с высокой долей вероятности свидетельствует о присоединившейся инфекции, что потребует дополнительного назначения антибиотиков при ранее выделяемом «инфекционнозависимом» обострении бронхиальной астмы, что не противоречит современным стандартам оказания помощи пациентам с астмой².

ЛИТЕРАТУРА

1. Гильманов А.Ж., Салыхова Р.М. Электрофорез сывороточных белков: современные возможности анализа. URL: <http://med.com.ua>. Загл. с экрана.
2. Сергеева Н.А. Электрофорез в современном диагностическом процессе // Клиническая лабораторная диагностика. 1999. № 2. С. 25-32.
3. Шевченко О.П., Долгов В.В., Олефиренко Г.А. Электрофорез в клинической лаборатории. Белки сыворотки крови. Тверь: Изд-во «Триада», 2006. 160 с.
4. Колб В.Г., Камашников В.С. Справочник по клинической химии. 2-е изд., перераб. и доп. Минск: Беларусь, 1982. 366 с.
5. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (пересмотр 2011 г.): пер. с англ. / под ред. А.С. Белевского. М.: Российское респираторное общество, 2012. 108 с.
6. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2011 г.): пер. с англ. / под ред. А.С. Белевского. М.: Российское респираторное общество, 2012. 80 с.
7. Аверьянов А.В., Поливанова А.Э. Нейтрофильная эластаза и болезни органов дыхания // Пульмонология. 2006. № 5. С. 74-79.
8. Аверьянов А.В., Поливанова А.Э. Дефицит α_1 -антитрипсина и хроническая обструктивная болезнь легких // Пульмонология. 2007. № 3. С. 103-109.
9. Хроническая обструктивная болезнь легких: монография / под ред. А.Г. Чучалина. 2-е изд., стереотип. М.: Атмосфера, 2011. 568 с.
10. Овчинникова Т.С. Активность эластазы и ее ингибиторов в индуцированной мокроте при ХОБЛ // Материалы Междунар. 65 науч. конф. им. Н.И. Пирогова (г. Томск, 2006 г.) / под ред. В.В. Новицкого и Л.М. Огородовой. Томск, 2006.
11. Норейко С.Б. Пневмония: диагностика и лечение // Новости медицины и фармации. Тематический выпуск «Антимикробная терапия». 2011. № 355.
12. Anthonisen N.R., Manfreda J., Warren C.P., Hershfield E.S., Harding G.K., Nelson N.A. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease // Ann. Intern. Med. 1987. Feb. V. 106 (2). P. 196-204.
13. Borg G. Psychophysical bases of perceived exertion // Med. Sci. Sports. Exerc. 1982. V. 14. P. 377-381.

Поступила в редакцию 23 апреля 2013 г.

Agapova Y.R., Gulina A.V. NEW WAY OF PRE-ASSESSMENT OF ANTI-PROTEASES ACTIVITY OF SERUM AND HUMORAL IMMUNITY WITH USE OF PROTEIN RESEARCH OF PATIENTS WITH COPD, ASTHMA, PNEUMONIA

The serum protein fractions by electrophoresis in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, asthma and pneumonia are studied. A new method of pre-assessment of humoral immunity and serum activity anti-proteases, including analysis of the share fractions $\alpha 2$ - and γ -globulins is proposed. By unfavorable prognostic signs it is recommended to consider the low values $\alpha 2$ of γ -fraction (for asthma and COPD) and at the lower limit of normal or less indicators $\alpha 2$ -globulin fraction (COPD), which, according to the authors, requires a special individual approach to treatment and rehabilitation.

Key words: acute exacerbation of COPD; asthma; pneumonia; protein fractions; serum; imbalance of proteolysis; secondary immunodeficiency; prognosis.