

Г.Л.Бородина, М.И.Дюсьмикеева, А.Д.Таганович, И.Л.Котович, А.Ф.Белько

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЕЧЕНИЯ САРКОИДОЗА НА ОСНОВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ ОБЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА В ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЕ

ГУ «НИИ пульмонологии и фтизиатрии» МЗ РБ,
Белорусский государственный медицинский университет

Изучена прогностическая значимость уровня фосфолипидов сурфактанта в индуцированной мокроте и на этой основе разработан новый способ прогнозирования саркоидоза, заключающийся в том, что при уровне ОЛФ в индуцированной мокроте в интервале от 55,67 до 92,13 мкМ Р/л можно прогнозировать неблагоприятное течение саркоидоза, а содержание ОЛФ в интервале от 95,76 до 180,44 мкМР/л свидетельствует в пользу благоприятного течения процесса.

Ключевые слова: саркоидоз, прогнозирование, уровень фосфолипидов сурфактанта, индуцированная мокрота.

H.L.Baradzina, M.I.Dusmikeeva, A.D.Taganovich, I.L.Kotovich, A.F.Belko

PROGNOSIS OF SARCOIDOSIS ON THE BASE OF INDUCED SPUTUM PRINCIPAL PHOSPHOLIPIDS LEVEL INVESTIGATION

The aim of our study was to estimate prognostic value of the induced sputum principal phospholipids level in sarcoidosis patient and elaborate new method of sarcoidosis prognosis. Our results suggest that induced sputum is an effective noninvasive technique to investigate the principal phospholipids level in sarcoidosis. The low contents of total lipid phosphorus in induced sputum (55.67 – 92.13 mM P/l) may be used as unfavorable prognostic factor and high level of total lipid phosphorus (95.76 – 180.44 mM P/l)-as favorable prognostic factor in sarcoidosis.

Kew words: sarcoidosis, prognosis, induced sputum, total lipid phosphorus.

В последние годы во всех международных документах, посвященных проблеме саркоидоза, приводятся данные

о том, что число больных саркоидозом в мире ежегодно увеличивается примерно на 2%, а течение его становится более тяже-

Оригинальная статья

лым [1]. В Республике Беларусь заболеваемость саркоидозом органов дыхания за последние 20 лет увеличилась почти в 3 раза и достигла в 2004 году уровня 6,0 на 100 000 населения [2]. Выявляется отчетливая тенденция к увеличению числа неблагоприятно протекающих форм заболевания, росту рецидивов саркоидоза и уменьшению частоты спонтанных регрессий [3].

Таким образом, рост заболеваемости саркоидозом за последние десятилетия, утяжеление его течения, трудности диагностики, отсутствие четких прогностических критериев и поражение наиболее трудоспособной молодой части населения превратили саркоидоз из редкого заболевания в одну из актуальных научных и медико-социальных проблем [1, 5].

В клинической практике пульмонолога и фтизиатра серьезную проблему представляет прогнозирование характера течения саркоидоза органов дыхания, поскольку благоприятное и неблагоприятное течение предполагают разные подходы к лечению. Однако, в связи с тем, что этиология и многие патогенетические механизмы саркоидоза до сих пор являются предметом научных дискуссий, четкие прогностические критерии процесса не разработаны. Поэтому прогнозирование характера течения саркоидоза является весьма актуальной научной проблемой и имеет важное практическое значение [10].

В результате недавних исследований было установлено, что уровень общих фосфолипидов легочного сурфактанта при саркоидозе органов дыхания может быть использован в качестве дополнительного диагностического и прогностического критерия заболевания [8]. Однако, несмотря на относительную безопасность бронхоскопии с исследованием лаважа, данный метод относится к инвазивным, связан с определенным риском для пациента, обладает рядом противопоказаний, достаточно сложен и требует оснащения дорогостоящим оборудованием.

Вместо лаважа в качестве исследуемого биологического материала целесообразно было бы использовать мокроту пациентов, однако, в большинстве случаев мокрота при саркоидозе спонтанно не отделяется. Решением данного вопроса является использование индуцированной мокроты, то есть полученной после ингаляции гипертонического раствора.

Метод исследования индуцированной мокроты отличается неинвазивностью, простотой выполнения, безопасностью для пациента, возможностью многократного получения материала, отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании и позволяет получить мокроту в 76-95% случаев даже у здоровых лиц. На основе сравнительного анализа диагностической эффективности исследования бронхоальвеолярных смывов (БАС) и индуцированной мокроты доказано, что индуцированная мокрота, так же как БАС, является универсальным биологическим материалом, отражающим характер патологических изменений в органах дыхания, и может использоваться для изучения общего уровня фосфолипидов сурфактанта.

Цель исследования: изучение прогностической значимости уровня общих фосфолипидов сурфактанта в индуцированной мокроте и разработка на этой основе нового способа прогнозирования саркоидоза.

Материал и методы

Для выполнения цели и решения задач исследования были обследованы 98 пациентов с саркоидозом органов дыхания в возрасте от 18 до 63 лет (средний возраст-31,5±6,2 лет). Все больные находились на стационарном лечении в клинике НИИ пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ. Диагноз заболевания устанавливался на основании комплекса клинико-рентгенологических, функциональных и морфологических данных (табл. 1). Все больные наблюда-

Таблица 1

Клиническая характеристика больных саркоидозом

Клинические признаки	Количество больных
Медиастинальная форма	53
Легочно-медиастинальная форма	39
Легочная форма	6
Бессимптомный саркоидоз	45
Неспецифические симптомы	28
Симптомы, связанные с вовлечением органов дыхания	27
Нормальная функция внешнего дыхания	63
Обструктивные нарушения функции внешнего дыхания (ФВД)	23
Рестриктивные нарушения ФВД	12

лись не менее 18 месяцев после исследования.

Методика получения индуцированной мокроты:

Индуцированную мокроту получали путем ингаляции гипертонического раствора с помощью ультразвукового небулайзера с последовательным повышением концентрации раствора NaCl (3-4-5% за 3 этапа продолжительностью 7 минут) и затем исследовали по методу Pin I., Gibson P.G., 1992 в модификации Popov T.A., Pizzichini M.M., Pizzichini E., 1995 [7].

Качество материала оценивали по полученному объему мокроты и степени примеси к ней слюны. Для выполнения исследования было достаточно 1 мл индуцированной мокроты. Отбирался материал с содержанием плоских эпителиальных клеток менее 20% от общего количества. Наиболее подходящими для исследования считались слизистые слепки размером более 4,5x9 мм, с минимальными примесями слюны. Для диспергирования и гомогенизации мокроты использовали приготовленный непосредственно перед исследованием раствор дитиотреитола (ДТТ), разрушающий дисульфидные связи гликопротеинов слизистого секрета и не оказывающий влияния на клеточные и растворимые факторы мокроты. Препарат разводился до 0,1% концентрации и добавлялся к мокроте в соотношении 1 мл раствора ДТТ на 1 мг мокроты. Смесь мокроты с ДТТ встряхивали в течение 10 минут, клеточную суспензию отмывали в сбалансированном солевом растворе Хенкса (на 1л 10-кратного раствора Хенкса требуется 80г NaCl; 4г KCl; 2г MgSO₄·7H₂O; 2,75г CaCl₂·6H₂O; 0,6г KH₂PO₄; 1,53г Na₂HPO₄·2H₂O; 10г глюкозы и дистиллированная вода до 1000,0), фильтровали через нейлоновую марлю и центрифугировали на центрифуге типа ОПМ-3 или ОС – 6М в течение 10 мин при 1000 об/мин. Для анализа использовали супернатант, полученный в процессе центрифугирования.

Количественное определение фосфолипидов

Липиды экстрагировали по методу J.Folch и соавт. [6] с использованием обычных растворителей. После разделения водной и липидной фракций нижний хлороформный слой, содержащий липиды, упаривали под струей газообразного азота. Сухой осадок липидов растворяли в 0,2 мл хлороформа («Реахим», Россия). Полученный экстракт использовали для количественного определения общего липидного фосфора методом V.E.Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, I.M. Vasendin (1975) [9]. Замер оптической плотности проб производили на СФ-26 (ЛОМО, Россия) при 815 нм. Количество фосфолипидов пересчитывали на 1 литр индуцированной мокроты и выражали в микромолях фосфора на литр (мкмоль Р/л).

Результаты и обсуждение

Особенности изменения содержания общих фосфолипидов легочного сурфактанта при саркоидозе органов дыхания на основе исследования индуцированной мокроты.

В ранее проведенных исследованиях было установлено, что при саркоидозе органов дыхания в БАС существенно снижается содержание общих фосфолипидов и основных фосфолипидных фракций сурфактанта [8]. По результатам исследования индуцированной мокроты выявлено, что при саркоидозе органов дыхания в индуцированной мокроте, так же как и в БАС, содержание уровня общего липидного фосфора существенно снижается по сравнению с пациентами контрольной группы (табл.2). К сожалению, судить об уровнях отдельных фракций фосфолипидов сурфактанта по анализу индуцированной мокроты не представляется возможным из-за небольшого объема биологического материала.

В результате сравнительного исследования образцов БАС и индуцированной мокроты обнаружена высокая положительная корреляция между уровнями фосфолипидов ($r=+0.72$ для общего липидного фосфора) в обеих биологических жидкостях. Таким образом, доказано, что индуцированная мокрота, так же как БАС, является универсальным биологическим материалом, отражающим характер патологических изменений в органах дыхания, и может использоваться для определения уровня фосфолипидов сурфактанта при саркоидозе.

Проведен ретроспективный анализ характера течения сарко-

Таблица 2

Содержание общего липидного фосфора (мкмольР/л) в индуцированной мокроте при саркоидозе

Показатель	Контроль, n=16	Больные саркоидозом, n=63
Общий липидный фосфор	219,2 ± 41,4	106,5 ± 23,5*

Примечание: *-p < 0,05;

идоза органов дыхания у обследованных лиц. В результате были выделены две группы больных: с благоприятным и неблагоприятным течением процесса. В качестве критериев, характеризующих динамику процесса, учитывались: клинические данные, рентгенологическая картина, необходимость применения кортикостероидных препаратов, наличие или отсутствие обострений и повторных госпитализаций за время наблюдения. Установлена закономерность, отражающая зависимость прогноза заболевания от степени снижения уровня общего липидного фосфора (ОЛФ) в индуцированной мокроте (рис.).

Неблагоприятное течение заболевания наблюдалось у пациентов с крайне низкими значениями ОЛФ ($73,9 \pm 9,3$ мкмоль Р/л). В этой группе пациентов отмечалось частое рецидивирование процесса и развитие пневмофиброза, что приводит впоследствии к дыхательной недостаточности.

Среди пациентов с относительно высоким уровнем общего липидного фосфора в индуцированной мокроте чаще отмечалась значительная положительная динамика в виде рассасывания инфильтратов и уменьшения размеров внутригрудных лимфоузлов вплоть до полной нормализации рентгенологической картины. В этой группе пациентов за весь период наблюдения после выписки (минимум 18 месяцев) не наблюдалось случаев рецидивирования. В целом, в группе больных с благоприятным исходом уровень ОЛФ в индуцированной мокроте составил $138,1 \pm 21,6$ мкмоль Р/л.

Разработка нового способа прогнозирования саркоидоза

На основании проделанных исследований разработан новый способ прогнозирования саркоидоза органов дыхания. Существующий в настоящее время метод прогнозирования течения саркоидоза состоит в исследовании фосфолипидного состава сурфактанта в бронхоальвеолярной лаважной жидкости методом тонкослойной хроматографии и анализа содержания общего липидного фосфора.

Задачей нового способа являлось повышение безопасности, возможность многократного получения материала, упрощение и удешевление способа при сохранении точности прогнозирования.

Сущность нового способа прогнозирования саркоидоза заключается в исследовании уровня фосфолипидов в индуцированной мокроте путем анализа содержания общего липидного фосфора.

Для вероятностной оценки различия между данными для благоприятного и неблагоприятного течения процесса были определены доверительные интервалы полученных показателей [4]. Предполагалось, что все данные по каждой из рассматриваемых групп имеют нормальное распределение признаков.

С вероятностью 95% все искомые значения уровня ОЛФ находятся в интервале $(M - km < a < M + km)$, где M – средняя величина, m – ошибка средней величины. По таблице для функции Лапласа – соответствующий коэффициент $k=1,96$.

Таким образом, у больных саркоидозом с неблагоприятным течением процесса с вероятностью 95% искомые значения уровня ОЛФ в индуцированной мокроте находятся в интервале:

$(73,9 - 1,96 \times 9,3 < a < 73,9 + 1,96 \times 9,3)$ или $(55,67 < a < 92,13)$,

а значения уровня ОЛФ у больных саркоидозом с благоприятным течением процесса с той же вероятностью находятся в интервале:

$(138,1 - 1,96 \times 21,6 < a < 138,1 + 1,96 \times 21,6)$ или $(95,76 < a < 180,44)$.

Следовательно, при уровне ОЛФ в индуцированной мокроте в интервале от 55,67 до 92,13 мкмоль Р/л можно прогнозировать неблагоприятное течение саркоидоза, а содержание ОЛФ в индуцированной мокроте в интервале от 95,76 до 180,44 мкмоль Р/л свидетельствует в пользу благоприятного течения процесса. При уровне ОЛФ ниже 55,67 мкмоль Р/л, выше 180,44 мкмоль Р/л или в интервале от 92,13 до 95,76 мкмоль Р/л точность прогнозирования снижается.

Клинический пример. Больная К., 1974 г. рождения, истории болезни №95 и №2678. Поступила в стационар ГУ НИИ ПФ 14.01.2003 г по поводу саркоидоза органов дыхания, легочно-медиастинальная форма, ДН 0. При поступлении жалоб не предъявляла. При объективном обследовании общее состояние удовлетворительное, в легких дыхание везикулярное, хрипов нет. Тоны сердца – ясные, ритмичные. Пульс 72 в минуту, АД-120/80. Рентгенологическое обследование: в верхних и средних отделах обоих

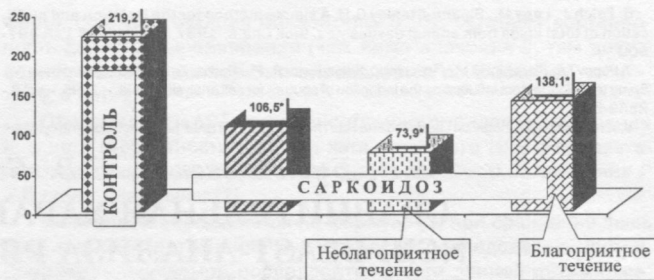


Рис. Содержание общего липидного фосфора (мкмоль Р/л) в индуцированной мокроте в зависимости от характера течения саркоидоза.

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

легких элементы мелкоочаговой диссеминации на фоне усиленного интерстициального компонента, корни малоструктурны, левый несколько расширен за счет лимфоузлов. Общий анализ крови: гемоглобин – 139 г/л; лейкоциты – $5,8 \times 10^6$; СОЭ-6 мм. рт. ст.; клеточная формула не изменена. Биохимический анализ крови без патологии. С целью прогнозирования дальнейшего течения саркоидоза использован предлагаемый способ определения прогноза заболевания. Содержание общего липидного фосфора составляло 65,2 мкмоль Р/л, что свидетельствовало о неблагоприятном течении процесса. В результате проведенного лечения при контрольном рентгенологическом обследовании через 28 дней было отмечено частичное рассасывание диссеминации и инволюция внутригрудной аденопатии. Однако спустя 7 месяцев после выписки из стационара самочувствие больной ухудшилось, появился кашель, аускультативно в обоих легких стали выслушиваться сухие хрипы, а на рентгенограмме зафиксировано ухудшение в виде резкого нарастания в обоих легких тяжисто-очаговой диссеминации. Корни легких оставались расширенными за счет лимфоузлов. Больная вновь была госпитализирована в стационар 20.11.2003 с диагнозом: саркоидоз органов дыхания, легочно-медиастинальная форма, прогрессирование, обструктивный синдром, ДН I-0. В последствии процесс приобрел волнообразный медленно прогрессирующий характер, требующий длительного использования системных кортикостероидов.

Таким образом, учитывая абсолютную неинвазивность и безопасность для пациента, а также относительную простоту выполнения при сохранении высокой точности прогнозирования новый способ прогнозирования характера течения саркоидоза может быть использован в практической работе всех медицинских учреждений, имеющих пульмонологические и фтизиатрические отделения.

По результатам исследований оформлена и принята к рассмотрению в Национальном Центре интеллектуальной собственности заявка на изобретение №а20040018 от 13.01.2004 года.

Выводы

1. Уровень общих фосфолипидов сурфактанта в индуцированной мокроте может быть использован в качестве прогностического критерия при саркоидозе органов дыхания. При уровне ОЛФ в индуцированной мокроте в интервале от 55,67 до 92,13 мкмоль Р/л можно прогнозировать неблагоприятное течение саркоидоза, а содержание ОЛФ в индуцированной мокроте в интервале от 95,76 до 180,44 мкмоль Р/л свидетельствует в пользу благоприятного течения процесса.

2. Способ прогнозирования течения саркоидоза на основе оценки уровня общих фосфолипидов сурфактанта в индуцированной мокроте обладает рядом клинико-диагностических и экономических преимуществ (точность прогнозирования саркоидоза, безопасность и неинвазивность, простоту выполнения).

Литература

1. Борисов С.Е. Саркоидоз органов дыхания (диагностика, лечение и профилактика): Автореф. дисс. докт. мед. наук. - М., 1995. - 42с.
2. Бородина Г.Л. Динамика заболеваемости и распространенности саркоидоза в Республике Беларусь // Белорусский Медицинский Журнал, № 3, Минск, 2005, с.4-5.
3. Дауров Б.И. Проблема реактивации саркоидоза и возможности ее решения: Автореф. дисс... докт. мед. наук. - М., 2004. - 41с.
4. Поляков И.В. Практическое пособие по медицинской статистике / И.В. Поляков, Н.С.Соколова. - Л.: Медицина, 1975. - 151с.
5. ATS/ERS/WASOG Committee. Statement on sarcoidosis // American Respiratory Critical Care Medicine. - 1999. - Vol. 160. - P. 736-755.

□ Оригинальная статья

6. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.*-1957.-Vol. 226, № 1.-P. 497-509.

7. Popov T.A., Pizzichini M.M., Pizzichini E., Kolendovicz R., Punthakee Z., Dolovich J., Hargreave F.E. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis // *Ibid.* – 1995. – vol.8.-P.559-565.

8. Tahanovich A.D., Katovich I.L., Baradzina H.L. The evaluation of BALF phospholipids and cytokine

release by alveolar macrophages as prognostic markers in sarcoidosis // *Respiration*, 2003, №4, Vol. 70, p.376-381.

9. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatogr.*-1975.-Vol. 114.-P. 129-141.

10. Ziegenhagen M.W., Benner U.K., Zissel G. Sarcoidosis: TNF- α release from alveolar macrophages and serum level of sIL-2R are prognostic markers // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*-1997.-Vol. 156.-P. 1586-1592.