

# ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА ЧАСТЫХ ОБОСТРЕНИЙ У НЕКУРЯЩИХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Кадушкин А.Г., Таганович А.Д.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** В работе изучалась значимость определения концентрации цитокинов, иммуноглобулинов и относительного количества субпопуляций лимфоцитов в периферической крови с учетом клинических данных о функциональном состоянии бронхо-легочной системы у некурящих пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) для оценки риска будущих обострений. Разработана достоверная статистическая модель в виде регрессионного уравнения, включающая три показателя (VEGF, С-реактивный белок, результат САТ-теста). Данная математическая модель позволяет прогнозировать с чувствительностью 85,0% и специфичностью 81,0% наличие у пациентов частых обострений в следующем году.

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, обострение, прогнозирование риска, VEGF, С-реактивный белок, САТ-тест.

**Введение.** Курение сигарет признается главным фактором риска развития хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Однако результаты обследований населения в разных странах, проведенных в последнее десятилетие, показали, что от 14,7 до 68,6% пациентов, страдающих ХОБЛ, никогда не курили [1].

Частые обострения ХОБЛ являются важными событиями в течении заболевания, поскольку приводят к длительно продолжающемуся (до нескольких недель) усугублению выраженности нарушений функции легких, снижают качество жизни пациента, способствуют развитию декомпенсации сопутствующих хронических заболеваний и требуют существенных экономических расходов на лечение. Более того, тяжелые обострения, требующие госпитализации, являются основной причиной смерти пациентов с ХОБЛ [2]. Поэтому прогнозирование риска будущих обострений крайне желательно, т. к. оно позволит своевременно корректировать комплекс лечебно-профилактических мероприятий, тем самым существенно повысить эффективность лечения ХОБЛ. При этом насущной проблемой является разработка критериев, прежде всего, частых обострений, чтобы они позволили своевременно выявлять и наблюдать за группами риска. До настоящего времени такие критерии отсутствуют [3].

Для ХОБЛ характерно накопление нейтрофилов и Т-лимфоцитов в легочной паренхиме и стенке дыхательных путей. Этим клеткам принадлежит ключевое значение в формировании деструктивных изменений легочной ткани. Межклеточные взаимодействия между ними и их функциональное состояние регулируют цитокины и иммуноглобулины [4]. Они участвуют в формировании воспалительных реакций, в т. ч. привлечении иммунокомпетентных клеток из кровотока в очаг воспаления.

Системное воздействие ХОБЛ на организм включает формирование воспалительного процесса, участником и маркером которого является С-реактивный белок (СРБ). Поэтому количественное изучение цитокинов, иммуноглобулинов, СРБ, а также субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови некурящих пациентов, страдающих ХОБЛ, представляется перспективным в поиске предикторов обострений.

**Цель работы** — определение значимости измерения концентрации цитокинов, иммуноглобулинов и относительного количества субпопуляций лимфоцитов в периферической крови, а также результатов клинического обследования (возраста, индекса массы тела, параметров функции внешнего дыхания, количества баллов по САТ-тесту, частоты предшествующих обострений) у некурящих пациентов с ХОБЛ для оценки риска будущих обострений.

**Материалы и методы.** Обследованы 42 некурящих пациента с ХОБЛ и 22 здоровых человека. Экземплярную выборку составили 20 пациентов с ХОБЛ. Характеристика участников исследования представлена в таблице 1. К некурящим были отнесены те, кто выкурил менее 100 сигарет за жизнь. ХОБЛ у обследованных некурящих пациентов была обусловлена вдыханием производственных вредностей, а также перенесенными тяжелыми инфекционными заболеваниями дыхательных путей в раннем детстве и/или частыми острыми респираторными заболеваниями в зрелом возрасте.

Таблица 1. — Характеристика участников исследования

Показатель	Группа сравнения пациентов с ХОБЛ	Экзаменационная группа пациентов с ХОБЛ	Здоровые некурящие люди
n	42	20	22
Возраст, годы	65,0 (62,0–68,0)	63,5 (62,0–67,5)	62,0 (59,0–65,0)
Пол, м/ж	30/12	5/15	5/17
ОФВ <sub>1</sub> после ингаляции бронхолитика, % от должн.	48,0 (41,0–60,0)	52,0 (48,0–61,5)	–
ОФВ <sub>1</sub> /ФЖЕЛ после ингаляции бронхолитика, %	64,0 (59,0–66,0)	62,5 (52,0–67,0)	–

В таблицах 1, 2 данные представлены как медиана и интерквартильный размах — между 25 и 75-м перцентилями.

Все пациенты были обследованы в период стабильного течения ХОБЛ. Критериями исключения являлись бронхиальная астма, атопия, аллергический ринит, туберкулез, острые инфекционные заболевания, нарушения свертывающей системы крови, прием системных глюкокортикостероидов в течение 2 мес. до исследования, неспособность правильно выполнить дыхательный маневр при тестировании функции внешнего дыхания.

Диагностика ХОБЛ осуществлялась на основании общепринятых критериев [5]. Пациенты, принимавшие участие в исследовании, имели преимущественно ХОБЛ среднетяжелой и тяжелой степени (по GOLD) [5]. Оценку качества жизни проводили с использованием шкалы CAT (COPD Assessment Test, оценочный тест по ХОБЛ).

В группу здоровых людей вошли некурящие добровольцы с нормальным уровнем объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ<sub>1</sub>) и нормальной величиной отношения объема форсированного выдоха за 1-ю секунду к форсированной жизненной емкости легких (ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ), не имевшие в анамнезе патологии бронхолегочной системы и других хронических заболеваний. Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании.

Для получения плазмы образцы центрифугировали по истечении 1 ч после взятия крови (3000 об./мин, 15 мин). До анализа образцы хранили при температуре -75°C. В плазме крови определяли концентрацию интерлейкина 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерферона  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), CXCL11, растворимой формы Fas-лиганда (sFasL), иммуноглобулина A (IgA), IgE, IgG, IgM, СРБ методами иммуноферментного анализа на иммуноферментном анализаторе «StatFax 3200» (Awareness Technology, Палм Сити, США) с использованием наборов реагентов производства предприятия Вектор-Бест (Новосибирск, РФ) и фирмы R&D Systems (Миннеаполис, США).

К 100 мкл крови добавляли по 10 мкл моноклональных антител. Панель антител включала CD45-ECD/CD3-APC/CCR5-PE/CXCR3-FITC, CD45-ECD/CD3-APC/CD8-PE/CD95-FITC, CD45-PC7/CD3-ECD/CD4-FITC/CD25-PC5/CD127-PE, CD45-ECD/CD20-FITC (R&D Systems; Beckman Coulter, Марсель, Франция). Анализ популяций лимфоцитов проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 с использованием программного обеспечения СХР (Beckman Coulter, США).

В течение 1 года после исследования подсчитывали количество обострений ХОБЛ. К пациентам с редкими обострениями относили тех, кто имел 0–1 обострений (n = 21). Частыми обострениями считали их количество  $\geq 2$  (n = 20) [6].

Результаты исследования обработаны непараметрическими методами вариационной статистики. Для сравнения данных между группами применяли U-критерий Манна–Уитни. При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали, равное 5%. Оценку интегральной диагностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью метода построения характеристических кривых (ROC-анализ). Для построения прогностической модели использовали метод бинарной логистической регрессии. Работоспособность модели проверяли на экзаменационной выборке.

**Результаты и их обсуждение.** У некурящих пациентов, страдающих ХОБЛ, наблюдается существенное изменение относительного количества субпопуляций лимфоцитов периферической крови. На это указывает увеличение процента CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CXCR3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> лимфоцитов и снижение доли CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов и отношения CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток. При сравнении результатов измерения уровня цитокинов и иммуноглобулинов имело место значимое увеличение IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , VEGF, CXCL11, IgA и IgE в плазме крови некурящих пациентов ХОБЛ по сравнению с группой некурящих здоровых людей. Уровень С-реактивного белка также превысил контрольные значения [7].

Параметры, значения которых существенно отличались у некурящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой некурящих здоровых людей, были проанализированы в зависимости от частоты обострений в течение 1 года после обследования. Такому же анализу были подвергнуты показатели клинического обследования па-

циентов (возраст, индекс массы тела, ОФВ<sub>1</sub>, ФЖЕЛ, ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ, результат САТ-теста, частота обострений в предыдущем году).

Полученные результаты показали, что из всех анализируемых показателей значительно более высокой была концентрация VEGF [180,0 (83,5–320,0) нг/л] и СРБ [11,8 (6,2–20,0) мг/л] у пациентов с частыми обострениями, чем у пациентов с редкими обострениями [45,0 (20,0–62,0) нг/л и 6,2 (3,9–10,8) мг/л соответственно]. Значение САТ также существенно различалось в зависимости от частоты обострений. У пациентов с частыми обострениями оно составило 24,5 (16,5–28,0) балла, а у пациентов с редкими обострениями — 14,0 (9,0–19,0) балла,  $p = 0,0114$ . Далее показатели VEGF, СРБ и САТ подвергли корреляционному анализу. Результаты позволили прийти к заключению, что все они умеренно коррелировали с частотой обострений в течение 1 года после обследования:  $R = 0,450$  ( $p = 0,0032$ ) для VEGF,  $R = 0,399$  ( $p = 0,0097$ ) для СРБ,  $R = 0,491$  ( $p = 0,0011$ ) для САТ.

Обнаруженная взаимосвязь дала основание включить эти показатели в ROC-анализ. Диагностическая эффективность каждого из них в отдельности для прогнозирования частоты обострений, вычисленная на основе их диагностической чувствительности и специфичности, находилась в пределах от 68,3 до 80,5% (таблица 2). Каждый из этих параметров характеризовался достаточно высокой прогностической значимостью, о чем свидетельствует площадь под ROC-кривой, которая находилась в пределах от 0,700 до 0,782.

Таблица 2. — Характеристики ROC-кривых для лабораторных и клинических показателей при оценке риска частых обострений пациентов с ХОБЛ

Показатель	Пороговое значение	ДЧ <sup>1</sup> (95% ДИ <sup>3</sup> )	ДС <sup>2</sup> (95% ДИ)	AUC <sup>4</sup> (95% ДИ)	p (vs AUC = 0,5) <sup>5</sup>
VEGF, нг/мл	>86	75,0 (50,9–91,3)	85,7 (63,7–97,0)	0,782 (0,626–0,896)	0,0003
СРБ, мг/л	>7,3	65,0 (40,8–84,6)	71,4 (47,8–88,7)	0,700 (0,537–0,833)	0,0172
САТ, баллы	>21	65,0 (40,8–84,6)	85,7 (63,7–97,0)	0,732 (0,571–0,858)	0,0058

Примечания:  
 1 — <sup>1</sup> — диагностическая чувствительность.  
 2 — <sup>2</sup> — диагностическая специфичность.  
 3 — <sup>3</sup> — доверительный интервал.  
 4 — <sup>4</sup> — площадь под ROC-кривой.  
 5 — <sup>5</sup> — уровень значимости, при котором оцениваемая AUC статистически значимо отличается от неинформативного значения 0,5.

Для повышения эффективности прогнозирования три отобранных лабораторных и клинических показателя анализировались методом бинарной регрессии. Пошаговое их включение в статистическую модель привело к составлению регрессионного уравнения, позволяющего прогнозировать вероятность развития у пациентов частых обострений с чувствительностью 85,0%, специфичностью 81,0% и диагностической эффективностью 82,9% (рисунок 1). Прогностическая ценность положительного результата для данной модели составила 81,0%, прогностическая ценность отрицательного результата — 85,0%.

$$Y = \frac{\exp(-3,416 + 0,009 \times X_1 + 0,0591 \times X_2 + 0,0885 \times X_3)}{1 + \exp(-3,416 + 0,009 \times X_1 + 0,0591 \times X_2 + 0,0885 \times X_3)}$$

Рисунок 1 — Уравнение логистической регрессии

Модель прогнозирует вероятность развития частых обострений (Y) для некурящих пациентов с ХОБЛ на основании: уровня VEGF (X<sub>1</sub>); концентрации С-реактивного белка (X<sub>2</sub>); и количества баллов по САТ-тесту (X<sub>3</sub>). Здесь, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> — предикторные переменные; числа перед X — коэффициенты регрессии;  $\exp(\approx 2,718)$  — основание натурального логарифма; -3,416 — свободный член, точка, в которой линия регрессии пересекает ось Y. Оптимальное пороговое значение вероятности для чувствительности и специфичности данной модели составляет 0,3991. Это значит, что если  $Y \leq 0,3991$ , то риск развития частых обострений ХОБЛ в течение следующих 12 мес. низкий, а если  $Y > 0,3991$ , то риск развития 2 и более обострений в течение следующих 12 мес. высокий.

Предикторные переменные были оценены на коллинеарность (независимость). Как известно, параметры в уравнении логистической регрессии должны быть независимы друг от друга, т. е. между ними должна отсутствовать сильная корреляционная связь. Коллинеарные переменные вносят в модель одинаковую информацию, в связи с чем в модель обычно включается только та из них, что обладает наиболее сильной связью с переменной отклика. В разработанной нами модели не было выявлено случаев сильной корреляционной связи между предикторными переменными.

В оцениваемой регрессионной модели  $-2\log$  Likelihood (удвоенный логарифм функции правдоподобия со знаком минус) из уравнения, содержащего только константу (начальный  $-2LL$ ), составляет 56,8. После добав-

ления факторных признаков 2LL снижается до 39,1. Снижение, или «качество приближения», составляет 17,7;  $p = 0,0005$ .

Для проверки согласованности модели с исходными данными применяли критерий согласия Хосмера–Лемешова. Тест показывает уровень значимости, при котором не отвергается гипотеза о допустимо незначительных расхождениях между фактической и модельной классификацией «редкие обострения ХОБЛ» – «частые обострения ХОБЛ». В данном случае для представленной модели достигнутый уровень значимости для этого критерия  $p > 0,05$ , т. е. принимается нулевая гипотеза о согласии модели и реальных данных.

Для оценки эффективности созданной модели был проведен ROC-анализ с построением кривой (рисунок 2). Вычисленная площадь под ROC-кривой составила 0,869, что соответствует «очень хорошему» качеству созданной модели согласно экспертной шкале AUC.

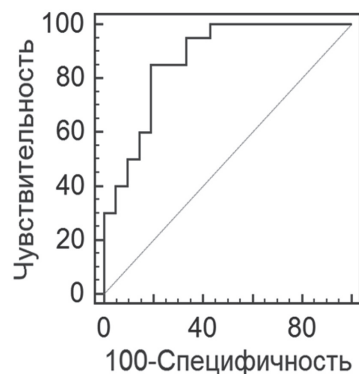


Рисунок 2. — График ROC-кривой для оценки эффективности модели логистической регрессии

Полученную модель проверяли на состоятельность на экзаменационной группе, состоящей из 20 некурящих пациентов с различной частотой обострений. Результаты проверки работоспособности (валидации) модели в экзаменационной выборке были следующими: специфичность — 78,6%, чувствительность — 83,3%, эффективность — 80,0%. Можно заключить, что построенная логистическая модель устойчиво работает на экзаменационной выборке.

**Заключение.** Результаты исследования позволяют сделать следующие обобщения:

1. У некурящих пациентов, страдающих ХОБЛ, с частыми (более 2 раз в год) обострениями по сравнению с пациентами с редкими (0–1 раз в год) обострениями выше уровень VEGF и С-реактивного белка в плазме крови, а также количество баллов по САТ-тесту. Для значений этих параметров установлена умеренная прямая корреляционная связь с частотой обострений.

2. Математическая модель оценки риска обострений хронической обструктивной болезни легких одновременно учитывает результаты определения в плазме крови VEGF и С-реактивного белка, а также количества баллов по САТ-тесту. Созданная модель обладает чувствительностью 85,0%, специфичностью 81,0%, диагностической эффективностью 82,9%, площадь под ROC-кривой для нее составляет 0,869 ( $p < 0,0001$ ).

#### Литература

1. Salvi, S.S. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers / S.S. Salvi, P.J. Barnes // *Lancet*. — 2009. — Vol. 374, № 9691. — P. 733–743.
2. Авдеев, С.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких: обострения / С.Н. Авдеев // *Пульмонология*. — 2013. — № 3. — С. 5–19.
3. Inflammatory biomarkers and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease / M. Thomsen [et al.] // *JAMA*. — 2013. — Vol. 309, № 22. — P. 2353–2361.
4. Barnes, P.J. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease / P.J. Barnes // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2009. — Vol. 41, № 6. — P. 631–638.
5. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary / J. Vestbo [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. — 2013. — Vol. 187, № 4. — P. 347–365.
6. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease / J.R. Hurst [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2010. — Vol. 363, № 12. — P. 1128–1138.
7. Уровень цитокинов в плазме крови некурящих и курящих пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А.Г. Кадушкин [и др.] // *Пульмонология*. — 2013. — № 6. — С. 27–32.

**SUPPORT OF THE USAGE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND C-REACTIVE PROTEIN FOR RISK ASSESSMENT OF FREQUENT EXACERBATIONS IN NON-SMOKING PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

*Kadushkin A.H., Tahanovich A.D.*

*Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus*

We evaluated the significance of measuring the levels of cytokines, immunoglobulins, the percentages of lymphocyte subpopulations in peripheral blood as well as clinical data on the functional state of bronchopulmonary system of non-smoking patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in order to assess the risk of future exacerbations. The final model to predict the frequency of exacerbations within 1 year included three variables: VEGF, C-reactive protein and CAT score, with sensitivity of 85.0% and specificity of 81.0%.

**Keywords:** chronic obstructive pulmonary disease, exacerbations, risk prediction, VEGF, C-reactive protein, CAT.

Поступила 13.05.2016