Федеральное государственное автономное учреждение здравоохранения

Больница Пущинского научного центра Российской академии наук

**Н.И. Косякова, И.Р. Прохоренко, Д.А. Серов,
Я.В. Радзюкевич, Л.А. Андреева, Е.В. Панкратова,
Н.В. Шибаев, П.А. Сахаров, Д.С. Кабанов**

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРОТЫ И КРОВИ
НА БИОМАРКЕРЫ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ
И ОЦЕНКА РОЛИ ПРЕСЕПСИНА,
РЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ И ЦИТОКИНОВ
В ПРОГНОЗЕ ОБОСТРЕНИЙ
И ТЯЖЕЛЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ
ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ**

Методические рекомендации
по внедрению результатов научно-поисковой работы

Москва
2021

УДК 616.2.008.616.24:615.83

ББК 53.0/57.8.614.4/616.1

К71

Согласовано Научно-координационный совет БПНЦ РАН.

Протокол № 13 от 21 ноября 2017 г.

**Косякова Н.И., Прохоренко И.Р., Серов Д.А., Радзюкевич Я.В.,
Андреева Л.А., Панкратова Е.В., Шibaев Н.В., Сахаров П.А.,
Кабанов Д.С.**

К71 Исследование мокроты и крови на биомаркеры системного воспаления и оценка роли пресепсина, регуляторных молекул и цитокинов в прогнозе обострений и тяжелых осложнений хронических заболеваний легких / Н.И. Косякова, И.Р. Прохоренко, Д.А. Серов, Я.В. Радзюкевич, Л.А. Андреева, Е.В. Панкратова, Н.В. Шibaев, П.А. Сахаров, Д.С. Кабанов. – М.: Издательский дом Академии Естествознания, 2021. – 35 с.

ISBN 978-5-91327-685-8

DOI 10.17513/np.462

В период сезонного подъема ОРВИ и гриппа ежегодно регистрируются тяжелые обострения хронических заболеваний легких, что ведет к росту удельного веса инвалидности и смертности, особенно среди лиц трудоспособного возраста. Поиск биомаркеров, позволяющих оценить тяжесть обострений и прогнозировать их течение, остается наиболее актуальной проблемой, что и стало целью настоящего исследования. Для решения поставленных задач использовали следующие методы: иммуноферментный анализ, молекулярно-биологический, микробиологический, иммунохемилюминесцентный. Статистический анализ проводился с использованием компьютерных программ Statistica 6.0 и 8.0.

Показана высокая диагностическая ценность нового биомаркера пресепсина в прогнозе тяжести обострения хронических заболеваний легких, определена степень корреляции с уровнем провоспалительных цитокинов и изменениями лейкоцитарной формулы, что позволило разработать алгоритм иммунопрофилактики обострений и внедрить его в практическое здравоохранение.

Рекомендации предназначены пульмонологам, терапевтам, иммунологам-аллергологам, врачам общей практики, врачам отделений интенсивной терапии и клинко-диагностических лабораторий.

ISBN 978-5-91327-685-8

© Н.И. Косякова, И.Р. Прохоренко,
Д.А. Серов, Я.В. Радзюкевич,
Л.А. Андреева, Е.В. Панкратова,
Н.В. Шibaев, П.А. Сахаров,
Д.С. Кабанов, 2021

© ИД «Академия Естествознания»

© АНО «Академия Естествознания»

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Материалы и методы исследования	8
Результаты исследования и их обсуждение	16
Заключение	22
Сведения об авторах	23
Список сокращений	24
Перечень опубликованных работ, выступлений, наличие патента по теме методических рекомендаций за последние три года	25
Список литературы	27
Приложение 1	29
Приложение 2	30

ВВЕДЕНИЕ

Острые и хронические респираторные заболевания являются серьезной проблемой из-за их широкой распространенности, как у детей, так и у взрослых. По данным Федеральной службы государственной статистики РФ, в целом в Российской Федерации в структуре причин возникновения инвалидности заболевания органов дыхания занимают третье место, а среди причин общей и младенческой смертности – четвертое место. Ежегодная заболеваемость и смертность детского и взрослого населения по причине болезней органов дыхания превышает уровни ряда европейских стран. В последние годы отмечен значительный прогресс в диагностике и лечении бронхиальной астмы (БА). Это связано с определением бронхиальной астмы как хронического воспалительного заболевания дыхательных путей и, как следствие, более широкого применения ингаляционных глюкокортикостероидов в качестве базисных противовоспалительных препаратов. Однако, несмотря на достигнутые успехи, уровень контроля над течением заболевания нельзя считать удовлетворительным. Эпидемиологические исследования, как среди детей, так и среди взрослых, особенно пожилых людей, свидетельствуют о том, что бронхиальная астма во многих случаях не диагностируется или подменяется другими диагнозами и, следовательно, неправильно лечится. Не лучше обстоит дело и с проблемой ХОБЛ. К большому сожалению, больные ХОБЛ обращаются за медицинской помощью уже на поздних стадиях заболевания, когда возможности терапии крайне ограничены. Так, по данным европейского респираторного Общества только 25 % случаев заболевания диагностируется своевременно. В России диагностика ХОБЛ находится на еще более низком уровне. По официальным данным Министерства здравоохранения РФ в стране насчитывается около 1 миллиона больных ХОБЛ, в то время как по данным эпидемиологических исследований число таких больных в нашей стране может превышать 11 миллионов человек [Синопальников и др., 2007]. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения, ХОБЛ к 2020 г. будет занимать 5-е место в мире по ущербу, наносимому болезнями в глобальном масштабе. В настоящее время ХОБЛ занимает 4-е место среди причин смертности в мире с прогнозируемым ростом распространенности и смертности в ближайшие десятилетия [Чучалин, 2003; McKenzie, 2003]. Принимая во внимание демографическую ситуацию в нашей стране, связанную со старением населения, ростом количества курильщиков, а также ухудшением экологической

обстановки, можно с большой долей вероятности предположить рост заболеваемости и смертности от ХОБЛ [Чучалин, 2004]. Коллектив экспертов GINA и GOLD-2014 подготовил и опубликовал документ «Diagnosis of diseases of chronic airflow limitation: asthma, COPD and asthma – COPD overlap syndrome», в котором освещается проблема перекрестного синдрома БА/ХОБЛ (ПС БА/ХОБЛ) – overlap syndrome [Белевский, 2014]. Наличие «overlap syndrome» в клинической практике вызывает трудности как в диагностическом, так и лечебном аспектах. Часто у таких пациентов, получающих ИГКС согласно протоколам лечения БА, не удается достичь контроля над симптомами БА. При наличии нейтрофильного воспаления в бронхах уменьшается эффективность действия ИГКС, которые, в свою очередь, увеличивают концентрацию нейтрофилов в дыхательных путях [Qiu et al., 2007]. Тяжелое обострение определяют как событие, требующее немедленных действий от врача в отношении пациента для предотвращения развития острой дыхательной недостаточности и смерти. По мнению Anthonisen и соавторов (1987), кардинальными признаками обострения ХОБЛ являются усиление одышки, увеличение объема мокроты, повышение гнойности мокроты. «Хроническое системное воспаление (ХСВ) – это типовой мультисиндромный патологический процесс, развивающийся при системном повреждении и характеризующийся тотальной воспалительной реактивностью эндотелиоцитов, плазменных и клеточных факторов крови, соединительной ткани, а на заключительных этапах – и микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах и тканях» [Черешнев, 2014]. Среди основных медиаторов ХСВ выделяют: провоспалительные интерлейкины (ИЛ-1, 2, 6, 8, 9, 12, 17), фактор некроза опухоли (ФНО- α), С-реактивный белок (С-РБ) и т. д. Ранее для мониторинга симптомов БА применяли определение количества клеток и протеинов периферической крови. Данных, подтверждающих ценность этих методов для оценки воспаления в дыхательных путях, очень мало. После обнаружения в 1991 г. связи уровня выдыхаемого оксида азота (ENO) с аллергическим воспалением в дыхательных путях, ENO было апробировано в качестве атравматичного биомаркера для оценки воспалительного процесса при БА. Кроме того, при обострении ХОБЛ и БА в крови пациентов обнаруживают повышенные концентрации фибриногена, Т-тропонина и С-реактивного белка. Синтез белков острой фазы воспаления в печени стимулируют: ИЛ-6, ИЛ-1 и сходные с ним по действию (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , факторы некроза опухолей ФНО- α и ФНО- β); глюкокортикоиды и др. *С-реактивный белок* (СРБ) возрастает при повреждении очень быстро (в первые 6–8 часов) и значительно (в 20–100 раз; в отдельных случаях – в 1000 раз). Появились работы о возможности использования нового биомаркера пресепсина в диагностике системных воспалительных реакций [Еремина и др., 2014]. Уровень провоспалительных

цитокинов, таких как ФНО- α , ФНО-1 β и ИЛ-6, значительно повышается при БА и ХОБЛ, что усиливает воспаление, в частности, за счёт активации транскрипционного ядерного фактора (NF)- κ B, тем самым приводя к повышенной экспрессии множества генов воспаления [Naitoh et al., 2010]. ФНО- α и ИЛ-1 β проявляют паракринное и аутокринное действие, активируя клетки к дальнейшему синтезу самих же интерлейкинов: ФНО- α и ИЛ-1 β , а также ИЛ-6 и ИЛ-8. Оценка секретируемой формы антагониста рецептора ИЛ-1, а именно ИЛ-1Ra, естественного ингибитора ИЛ-1 β [Carpintero et al., 2014], позволит прогнозировать дальнейшие изменения в цитокиновом статусе у наблюдаемых пациентов. Это также относится и к исследованию уровней интерферона-гамма, который подавляет синтез ИЛ-8 [Cassatella et al., 1993]. Достаточно широкий спектр интерлейкинов, регистрируемый у наблюдаемых пациентов до назначения медикаментозного лечения, позволит более точно подобрать курс терапии данного воспалительного процесса, а после его прохождения – оценить эффективность и адекватность применяемой терапии. [Barnes, 2009]. Это послужило целью настоящего исследования.

Цель – провести поиск наиболее значимых в диагностическом и прогностическом плане биомаркеров обострения хронических заболеваний легких и изучить роль пресепсина как одного из наиболее значимых биомаркеров обострения БА и ХОБЛ.

Научная новизна. Пресепсин является фрагментом растворимой формы рецептора CD14, который высвобождается разными иммунными клетками (нейтрофилами, моноцитами, макрофагами) после стимуляции патогенами. При этом пресепсин образуется из CD14 лизосомальными протеиназами, после того как активируется фагоцитоз. Результат анализа используется для диагностики и прогноза развития системного воспаления, прежде всего при угрозе наиболее тяжелых осложнений. CD14 активирует TLR4-специфичный провоспалительный сигнальный каскад и тем самым запускает воспалительную реакцию организма против инфекционных агентов. Комплекс LPS-LBP-CD14 высвобождается в кровь путем диссоциации CD14 от клеточной мембраны с образованием растворимого CD14 (sCD14). Однако за счет активности протеаз плазмы образуется и другой тип молекул sCD14 – молекула, которая носит название sCD14 подтип ST (sCD14-ST), или пресепсин [14]. Уровни пресепсина значительно выше у пациентов с системными воспалительными реакциями, нежели у пациентов с ССВО (синдром системного воспалительного ответа) или у практически здоровых людей. [Болдина М. и др., 2014]. Определение концентрации пресепсина может быть полезным не только для диагностики и прогноза исхода сепсиса, но и для мониторинга течения заболевания других системных воспалительных процессов, что было показано в ходе настоящего исследования. Считается, что молекулярный механизм хронического воспалительного

процесса в респираторном тракте тесно связан с активацией Toll-подобного рецептора 4 [Basu, Fenton, 2004] и с последующим высвобождением TNF-а и других провоспалительных цитокинов из гранул тучных клеток. Ранее Verstrepen et al. (2008) показали, что активация Toll-подобного рецептора 4 может быть вызвана как аллергенами (*Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae*), так и липополисахаридами (ЛПС) бактерий, что объединяет патогенез БА и ХОБЛ. Изучение в динамике индуцированной продукции провоспалительных цитокинов позволит точнее понять механизм развития хронического воспаления респираторного тракта, что послужило предметом настоящего исследования.

Работа выполнена в рамках госзадания на 2015–2017 гг.
Регистрационный номер АААА-А17-117051210062-4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень доказательств и сила рекомендаций каждого положения методических рекомендаций взвешены и оценены в соответствии с известными шкалами Классы рекомендаций и Уровень доказательств. Уровень доказательств А – С, классы рекомендаций I, II, IIА, IIВ).

Классы рекомендаций

Класс рекомендаций	Описание	Предлагаемое использование в практике
I	Доказательства и/или общее соглашение, что данный метод лечения или диагностики полезен и эффективен	Рекомендуется/показан
II	Спорные доказательства и/или расхождения во мнении экспертов о пользе/эффективности данного метода лечения или диагностики	Следует рассмотреть применение данного метода
IIА	Доказательства/мнение экспертов склоняются в сторону эффективности/пользы	->-
IIВ	Эффективность/польза менее подтверждены доказательствами/мнением экспертов	Применение данного метода может обсуждаться
III	Доказательства и/или общее соглашение, что данный метод лечения или диагностики бесполезен и неэффективен, а в отдельных случаях может нанести вред	Не рекомендуется

Уровень доказательств

Уровень доказательств	Источник данных
A	Многочисленные рандомизированные клинические исследования и метаанализы
B	Отдельные или крупные рандомизированные клинические исследования, нерандомизированные клинические исследования
C	Согласительное мнение экспертов и/или небольшие исследования, ретроспективные исследования, регистры

Исследование проводилось на базе БПНЦ РАН совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной биомедицины ИФПБ РАН. Все пациенты подписали информированное согласие. Всем пациентам при первичном обращении был проведен ретроспективный анализ амбулаторных карт с целью уточнения диагноза бронхиальной астмы и ХОБЛ.

Диагноз бронхиальной астмы и ХОБЛ подтверждался:

- сбором анамнеза;
- аллергологическим обследованием;
- оценкой одышки по шкале mMRC – в баллах, АСТ-тестом – в баллах, опросником качества жизни – ACQ – в баллах.
- пробой 6-минутной дозированной ходьбы;
- исследованием функции внешнего дыхания с использованием компьютерной программы Валента и портативного спирографа, бронхомоторной пробой с сальбутамолом 400 мкг и исследованием сатурации кислорода в динамике;
- мониторингом пиковой скорости выдоха (ПСВ);
- холтер ЭКГ, АД и определением апноэ во сне;
- КТГ органов грудной клетки;
- клиническим анализом крови с подсчетом абсолютного количества эозинофилов и лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИ) по соотношению лимфоцитов к сегментоядерным лейкоцитам [17];
- биохимическим анализом крови: АЛТ/АСТ, гамма ГГТП, Щ.Ф., общий белок, глюкоза, холестерин, мочевины, креатинин по стандартным методикам в клинико-диагностической лаборатории БПНЦ РАН;
- СРБ количественным иммунотурбодиметрическим методом с использованием набора реагентов «ДДС» (Россия) на биохимическом автоматическом анализаторе BS-400 Mindray (КНР);
- количественным определением прокальцитонина методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «Вектор-Бест» (Россия) на полуавтоматическом планшетном фотометре Stat Fax 2100 и шейкер-инкубаторе Stat Fax 2200 (Awareness Technology Inc);
- определением общего IgE количественным иммунотурбодиметрическим методом с латексным усилением кинетики фиксированного времени. Набор реагентов «DiaSys» (Германия) на биохимическом автоматическом анализаторе BS-400 Mindray (КНР);
- количественным определением пресепсина с использованием тест-системы (PATHFAST Presepsin) для *in vitro* диагностики на анализаторе PATHFAST (Япония) и количественного определения концентрации пресепсина (sCD14-ST) в цельной крови и плазме. Определение пресепсина осуществлялось методом хемилюминесцентного иммуноферментного анализа (CLEIA). В тесте использовались моноклональные и поликлональные антитела против пресепсина. Все необходимые для проведения тестирования компоненты упакованы в одном картридже. После загрузки картриджа в диагностический анализатор PATHFAST количественный результат получали через 15–17 мин.

Цитокиновый статус (IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, TNF- α , IFN- γ) в плазме крови пациентов определяли с помощью иммуноферментного анализатора MUL-

TISKAN FC (Thermo Scientific Microplate Reader, США) по методике, прилагаемой к тестовым системам производства ООО «Цитокин» (С.-Петербург).

Забор крови

Работа выполнена на гепаринизированной периферической крови пациентов по информированному согласию на проведение исследований. Забор крови проводили в клинических условиях в пробирки BD Vacutainer («Becton Dickinson and Company», UK), обработанные гепарином натрия (17 ед/мл).

Отбор крови осуществляли перед началом терапии (09.06.2016 – 10.06.2016) и через две недели после назначения терапии (23.06.2016 – 27.06.2016).

Непосредственно перед экспериментами по стимуляции цельной крови эндотоксинами из части цельной крови (4 мл) в стерильных условиях отбирали цельную сыворотку. Для этого кровь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин при +4 °С.

Активация клеток эндотоксинами

Гепаринизированную кровь развели средой RPMI 1640 в соотношении 1:9 и разносили по 1 мл в 24-луночные планшеты «Cellstar» («Greiner bio-one», Германия). Для исследования влияния ЛПС на секрецию цитокинов клетками цельной крови в пробы добавляли ЛПС из *E. coli* в конечной концентрации 100 нг/мл. Все пробы были выполнены в дубликатах. Инкубировали пробы в CO₂-инкубаторе Joan 150 (Франция) при температуре +37 °С, 100 % влажности воздуха и содержании CO₂, равном 5 %.

Для определения уровней наработки в пробах цельной крови ранних цитокинов TNF-α и IL-6 пробы инкубировали в течение 6 ч.

Для определения уровней наработки в пробах цельной крови поздних цитокинов IL-1β, IL-1Ra и IFN-γ пробы инкубировали в течение 24 ч.

После окончания инкубации пробы центрифугировали в центрифуге для планшетов MLC-3000 («Biosan», Латвия) 10 мин при 1000 об/мин и комнатной температуре. Супернатанты отбирали в стерильные криопробирки CRYO S («Greiner Bio-One GmbH», Германия), замораживали и хранили при -20 °С до процедуры измерения.

Определение концентрации TNF-α в образцах

Для определения концентрации TNF-α в пробах использовали набор реактивов для иммуноферментного анализа фактора некроза опухоли человека «ИФА-TNF-alpha» (ООО «Цитокин») согласно инструкции производителя.

1. В ячейки иммуноферментной тест-системы для определения TNF-α вносили по 100 мкл аналитического «Буфера А» из коммерческого набора для измерения цитокина.

2. В соответствующие ячейки вносили по 100 мкл калибровочных проб, с известной концентрацией TNF-α или образцов супернатантов (в дубликатах), разведенных в среде RPMI 1640 в соотношении 1:2.

3. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при +37 °С со встряхиванием на термостатируемом шейкере ST-3 («ELMI», Латвия).

4. После инкубации ячейки промывали три раза промывочным буфером «Буфер Р» с использованием специализированного автоматического промывателя планшетов «Wellwash Versa» («Thermo Scientific», США).

5. Далее в ячейки вносили по 100 мкл раствора вторичных антител к TNF- α , конъюгированных с биотином. Инкубировали стрипы при +37 °C в течение 1 ч со встряхиванием.

6. По окончании инкубации стрипы промывали согласно п. 4 и вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора пероксидазы хрена, конъюгированной со стрептавидином («Конъюгат Е»). Инкубировали плашки 30 мин при +37 °C со встряхиванием. По окончании инкубации лунки промыли (п. 4).

7. Вносили во все лунки свежеприготовленную субстратную смесь, содержащую 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, и инкубировали плашки в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин.

8. Останавливали развитие хромогенной реакции добавлением по 50 мкл 1 М фосфорной кислоты («стоп-реагент»).

9. Измеряли оптическую плотность образцов в ячейках с помощью иммуноферментного анализатора «STAT FAX 3200» (США) при длине волны 450 нм. Минимальная достоверно определяемая иммуноферментной тест-системой концентрация цитокина составляла 1 пг/мл.

Результаты измерений представлены в приложении А.

Определение концентрации IL-6 в образцах

Для определения концентрации IL-6 в пробах использовали набор реактивов для иммуноферментного анализа интерлейкина-6 человека «ИФА-IL-6» (ООО «Цитокин») согласно инструкции производителя.

1. В ячейки иммуноферментной тест-системы для определения IL-6 вносили по 100 мкл аналитического «Буфера А» из коммерческого набора для измерения цитокина.

2. В соответствующие ячейки вносили по 100 мкл калибровочных проб, с известной концентрацией IL-6 или образцов супернатантов (в дубликатах), разведенных в среде RPMI 1640 в соотношении 1:2.

3. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при +37 °C со встряхиванием на термостатируемом шейкере ST-3 («ELMI», Латвия).

4. После инкубации ячейки промывали три раза промывочным буфером «Буфер Р» с использованием специализированного автоматического промывателя планшетов «Wellwash Versa» («Thermo Scientific», США).

5. Далее в ячейки вносили по 100 мкл раствора вторичных антител к IL-6, конъюгированных с биотином. Инкубировали стрипы при +37 °C в течение 1 ч со встряхиванием.

6. По окончании инкубации стрипы промывали согласно п. 4 и внесли в каждую лунку по 100 мкл раствора пероксидазы хрена, конъюгированной со стрептавидином («Конъюгат Е»). Инкубировали плашки 30 мин при +37 °C со встряхиванием. По окончании инкубации лунки промыли (п. 4).

7. Вносили во все лунки свежеприготовленную субстратную смесь, содержащую 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, и инкубировали плашки в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин.

8. Останавливали развитие хромогенной реакции добавлением по 50 мкл 1 М фосфорной кислоты («стоп-реагент»).

9. Измеряли оптическую плотность образцов в ячейках с помощью иммуноферментного анализатора «STAT FAX 3200» (США) при длине волны 450 нм. Минимальная достоверно определяемая иммуноферментной тест-системой концентрация цитокина составляла 5 пг/мл.

Результаты измерений представлены в приложении Б.

Определение концентрации IL-1 β в образцах

Для определения концентрации IL-1 β в пробах использовали набор реактивов для иммуноферментного анализа интерлейкина 1 β «ИФА-ИЛ-1-БЕТА» (ООО «Цитокин») согласно инструкции производителя.

- Плашку заполняли промывочным буфером, внося в каждую лунку 300 мкл, и оставляли на 5 мин. После инкубации плашку промыли два раза с использованием автоматического промывателя планшетов «Wellwash Versa» («Thermo Scientific», США).

- В ячейки иммуноферментной тест-системы для определения IL-1 β вносили по 25 мкл аналитического «Буфера О» из коммерческого набора для измерения цитокина.

- В соответствующие ячейки вносили по 100 мкл калибровочных проб с известной концентрацией IL-1 β или образцов супернатантов (в дубликатах), разведенных в среде RPMI 1640 в соотношении 1:1.

- Планшеты инкубировали в течение 2 ч при +25 °С со встряхиванием на термостатируемом шейкере ST-3 («ELMI», Латвия).

- После инкубации ячейки промывали три раза промывочным буфером «Буфер Р» с использованием специализированного автоматического промывателя планшетов «Wellwash Versa» («Thermo Scientific», США).

- Далее в ячейки вносили по 100 мкл раствора вторичных антител к IL-1 β , конъюгированных с биотином. Инкубировали стрипы при +25 °С в течение 1 ч со встряхиванием.

- По окончании инкубации стрипы промывали четыре раза согласно п. 1 и вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора пероксидазы хрена, конъюгированной со стрептавидином («Конъюгат Е»). Инкубировали плашки 20 мин при +25 °С со встряхиванием. По окончании инкубации лунки промывали четыре раза (п. 1).

- Вносили во все лунки свежеприготовленную субстратную смесь, содержащую 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, и инкубировали плашки в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин.

- Останавливали развитие хромогенной реакции добавлением по 50 мкл 1 М фосфорной кислоты («стоп-реагент»).

• Измеряли оптическую плотность образцов в ячейках с помощью иммуноферментного анализатора «STAT FAX 3200» (США) при длине волны 450 нм. Минимальная достоверно определяемая иммуноферментной тест-системой концентрация цитокина составляла 6,3 пг/мл.

Результаты измерений представлены в приложении В.

Определение концентрации IL-1Ra в образцах

Для определения концентрации IL-1Ra в пробах использовали набор реактивов для иммуноферментного анализа рецепторного антагониста интерлейкина-1 «ELISA-IL-1Ra» (ООО «Цитокин») согласно инструкции производителя.

1. Плашку заполняли промывочным буфером, внося в каждую лунку 250 мкл, и оставляли на 5 минут. После инкубации плашку промыли два раза с использованием автоматического промывателя планшетов «Wellwash Versa» («Thermo Scientific», США).

В ячейки иммуноферментной тест-системы для определения IL-1Ra вносили по 100 мкл аналитического «Буфера А» из коммерческого набора для измерения цитокина.

2. В соответствующие ячейки вносили по 100 мкл калибровочных проб с известной концентрацией IL-1Ra или образцов супернатантов (в дубликатах), разведенных в среде RPMI 1640 в соотношении 1:2.

3. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при +37 °С со встряхиванием на термостатируемом шейкере ST-3 («ELMI», Латвия).

4. После инкубации ячейки промывали пять раз промывочным буфером «Буфер Р» с использованием специализированного автоматического промывателя планшетов «Wellwash Versa» («Thermo Scientific», США).

5. Вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора пероксидазы хрена, конъюгированной со стрептавидином («Конъюгат Е»). Инкубировали плашки 1 ч при +37 °С со встряхиванием.

6. Вносили во все лунки свежеприготовленную субстратную смесь, содержащую 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, и инкубировали плашки в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин.

7. Останавливали развитие хромогенной реакции добавлением по 50 мкл 1 М фосфорной кислоты («стоп-реагент»).

8. Измеряли оптическую плотность образцов в ячейках с помощью иммуноферментного анализатора «STAT FAX 3200» (США) при длине волны 450 нм. Минимальная достоверно определяемая иммуноферментной тест-системой концентрация цитокина составляет 50 пг/мл.

Результаты измерений представлены в приложении Г.

Определение концентрации IFN-γ в образцах

Для определения концентрации IFN-γ в пробах использовали набор реактивов для иммуноферментного анализа интерферона-гамма человека «ИФА-IFN-gamma» (ООО «Цитокин») согласно инструкции производителя.

1. В ячейки иммуноферментной тест-системы для определения TNF- α вносили по 100 мкл аналитического «Буфера А», из коммерческого набора для измерения цитокина.

2. В соответствующие ячейки вносили по 100 мкл калибровочных проб, с известной концентрацией IFN- γ или образцов супернатантов (в дубликатах), разведенных в среде RPMI 1640 в соотношении 1:2.

3. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при +37 °C со встряхиванием на термостатируемом шейкере ST-3 («ELMI», Латвия).

4. После инкубации ячейки промывали три раза промывочным буфером «Буфер Р» с использованием специализированного автоматического промывателя планшетов «Wellwash Versa» («Thermo Scientific», США).

5. Далее в ячейки вносили по 100 мкл раствора вторичных антител к IFN- γ , конъюгированных с биотином. Инкубировали стрипы при +37 °C в течение 1 ч со встряхиванием.

6. По окончании инкубации стрипы промывали согласно п. 4 и вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора пероксидазы хрена, конъюгированной со стрептавидином («Конъюгат Е»). Инкубировали плашки 30 мин при +37 °C со встряхиванием. По окончании инкубации лунки промыли (п. 4).

7. Вносили во все лунки свежеприготовленную субстратную смесь, содержащую 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, и инкубировали плашки в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин.

8. Останавливали развитие хромогенной реакции добавлением по 50 мкл 1 М фосфорной кислоты («стоп-реагент»).

9. Измеряли оптическую плотность образцов в ячейках с помощью иммуноферментного анализатора «STAT FAX 3200» (США) при длине волны 450 нм. Минимальная достоверно определяемая иммуноферментной тест-системой концентрация цитокина составляла 20 пг/мл.

Результаты измерений представлены в приложении 2.

Общий анализ мокроты + ВК + АК + кристаллы Куршмана.

В индуцированной мокроте, в слизи из носа и зева изучали количество нейтрофилов и эозинофилов в соответствии с рекомендациями ERS [18].

Дисбиоз слизистых верхних дыхательных путей и бактериологическое исследование мокроты проводили по стандартным методикам для клинико-диагностических и бактериологических лабораторий, утвержденных МЗ РФ.

Изучение роли вирусной этиологии в обострении хронических заболеваний легких проводилось молекулярно-биологическим методом (ПЦР), который на сегодняшний день признан самым быстрым и достоверным в лаборатории «СитиЛаб».

Риноцитогаммой с подсчетом процентов эозинофилов и нейтрофилов в мазке из 100 клеток.

Клинико-лабораторное и иммуно-серологическое обследование включало определение общего IgE, СРБ, пресепсина, прокальцитонина и проводилось на базе клинико-диагностической лаборатории БПНЦ РАН.

В группу наблюдения не включались пациенты, имеющие тяжелые заболевания сердечно-сосудистой системы (ОНМК, ОИМ, ХСН, нарушения сердечного ритма), декомпенсированный сахарный диабет второго типа, туберкулез легких, ВИЧ, гепатиты, острые и другие тяжелые хронические заболевания.

Статистическая обработка осуществлялась с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0 и 8.0. При статической обработке использовались методы описательный, параметрический и непараметрический, с подсчетом средней арифметической (M), медианы, среднего квадратичного отклонения (σ), средней ошибки средней арифметической ($\pm m$), доверительного интервала (ДИ), коэффициента достоверности показателя (t) и достоверности различий при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под динамическим наблюдением находились 78 пациентов, которые проходили полное клинико-лабораторное и функциональное обследование в отделении иммунологии и аллергологии с верифицированным диагнозом бронхиальной астмы и ХОБЛ. С частыми обострениями БА в сочетании с ХОБЛ было 20 больных. Лиц мужского пола – 8 пациентов (40 %), женского – 12 (60 %). Средний возраст составил $45 \pm 2,4$ лет, давность заболевания более 10 лет. С клиническими признаками БА и ХОБЛ 1-2 степени было 11 пациентов, с тяжелым течением БА – 2 пациента, с ХОБЛ 2-3 степени без признаков БА – 2 пациента. У 58 пациентов БА и ХОБЛ протекали без частых обострений. Лиц мужского пола было 19 пациентов (32,7 %), женского – 39 (67,3 %). Средний возраст составил $49 \pm 3,4$ лет. С клиническими признаками БА и ХОБЛ 1-2 степени было 14 пациентов, с тяжелым течением БА – 6, со средне-тяжелым течением БА – 22 пациента, с ХОБЛ 2-3 степени без признаков БА – 16 пациентов. В период обострения у всех пациентов существенно снижались показатели качества жизни и ОФВ1. При микробиологическом исследовании высевались: *Streptococcus (Str.) pneumoniae* – 32,4 %, *Haemophilus (H.) influenza* – 26,2 %, *Staphylococcus (S.) aureus* – 31,4 %, *Mycoplasma pneumoniae* – 4,2 %, *Chlamidia pneumoniae* – 3,9 %. За последние годы изменился спектр микрофлоры. Наряду с грамположительными микроорганизмами чаще стали высеваться грамотрицательные бактерии, которые сами являются активными продуцентами бета-лактамаз широкого спектра. Так, *Proteus vulgaris* высевался в мокроте у пациентов БА/ХОБЛ в $6,5 \pm 1,4$ % случаев, в группе контроля – 0 %, при $p < 0,01$; *E.coli* – в $13,8 \pm 1,5$ % случаев, в гр. контроля – $2,3 \pm 0,1$ %, при $p < 0,01$. Возросла частота выявления ДНК герпетической инфекции при обострении БА и ХОБЛ. Так в 2015 г. диагноз хронической рецидивирующей герпетической инфекции (ВПГ 1-2 тт., ВЭБ) был верифицирован у 11,2 % пациентов, а в 2017 г. – у 18,6 % больных.

За 36 месяцев наблюдения у 8 пациентов с БА+ХОБЛ, с частыми обострениями, наблюдались инфекционные заболевания в виде пневмонии у 5 пациентов и хронического гайморита у 3 пациентов. Вновь обследовано в Больнице ПНЦ РАН за три года было 156 пациентов с различными клиническими формами бронхиальной астмы. Возраст пациентов от 16 до 75 лет. Преобладали пациенты от 41 года до 50 лет – 26,5 %, старше 60 лет – 7,2 %. Пациенты женского пола составили 54 %. Все пациенты прошли аллер-

гологическое обследование. У 63 пациентов в 58 % случаев выявлялась сенсibilизация к бытовым аллергенам, в 16 % – к грибковым, в 30 % – к пыльцевым. 35 (35,7 %) пациентов страдали неатопической бронхиальной астмой и 63 (64,3 %) пациента – atopической бронхиальной астмой. Среди пациентов с неатопической формой заболевания преобладали лица старше 40 лет, в то же время группа с atopической БА характеризовалась более молодым возрастным составом, средний возраст $21,2 \pm 2,6$ год. Среди пациентов с неатопической формой БА по GINA-16 преобладали больные с 3-й степенью терапии заболевания – 51,4 %, со 2-й степенью – 31,4 %, и с 1-й степенью – 17,2 %. Среди пациентов с atopической формой БА соответственно преобладали больные со 2-й степенью терапии заболевания – 42,9 %, с 3-й степенью их было 36,5 %, и с 1-й степенью – 20,6 %. При анализе гемограммы пациентов с 3-й степенью БА в подавляющем большинстве случаев (72,2 %) отмечалось угнетение лейкоцитарного ростка (лейкопения) и абсолютный моноцитоз, что свидетельствует о хронизации инфекционно-воспалительного процесса. ЛИ у этих пациентов был ниже 0,48, что также подтверждало наличие хронического воспалительного процесса с клинико-лабораторными признаками хронической эндогенной интоксикации (снижение ЛИ, повышенные значения СРБ, продуктов перекисного окисления липидов и др). У всех пациентов этой группы имелись хронические очаги инфекции верхних дыхательных путей (хронические риносинуситы, гаймориты, тонзиллиты). У 16 пациентов впервые был верифицирован диагноз бронхиальной астмы atopической, персистирующей, легкой. Показатели ОФВ₁ были более 80 % должного, прирост объема форсированного выдоха за первую секунду более 200 мл (> 12 %) после пробы с 400 мкг сальбутамола отмечен у всех пациентов. Сопутствующие аллергические заболевания имели 14 пациентов, из них 9 – аллергический ринит и риноконъюнктивит, 2 пациента – atopический дерматит и 3 пациента – крапивницу. Значения общего IgE были повышенными – $228,8 \pm 53,4$ МЕ/мл и определялись в диапазоне от 78 до 1076 МЕ/мл, пресепсина – от 56 до 2298 пкг/мл, средние значения $-159,8 \pm 31,4$ пкг/мл в период клинической ремиссии заболевания.

Методом случайной выборки были сформированы две группы пациентов БА и ХОБЛ с частыми обострениями и без частых инфекционных обострений.

Пациенты с дебютом бронхиальной астмы вошли в третью группу наблюдения:

- Группа № 1 – 65 пациентов с ХОБЛ и БА в возрасте 18–75 лет, имеющих частые инфекционные обострения верхних дыхательных путей. Пациенты этой группы были обследованы трижды – до терапии и через 3 и 9 месяцев после назначения базисной терапии.

- Группа № 2 – 63 пациента без частых инфекционных обострений ХОБЛ и БА. Обследование было трехкратное, до и на фоне базисной терапии через 3 и 9 месяцев.

• Группа № 3 – 16 пациентов с дебютом бронхиальной астмы, которым проводилось исследование уровня пресепсина, прокальцитонина в первые сутки обострения и на 3–5 дни лечения, а также показатели цитокинового статуса – трижды – до базисной терапии, через 1 и 3 месяца терапии.

У пациентов 3 группы наблюдения проводился забор крови для исследования цитокинового статуса до начала базисной терапии и в дальнейшем эти пациенты были распределены на две подгруппы в зависимости от назначенной базисной терапии:

- 3-а группа – 7 пациентов стали получать монтелукаст;
- 3-б группа – 9 пациентов, которым был назначен иГКС (флутиказон пропионат).

При нетяжелых обострениях пациентам разрешалось использовать β -2-агонисты короткого действия в виде дозированного ингалятора или через небулайзер.

Динамика функциональных тестов, данных анкетирования и маркеров системного воспаления пациентов БА и ХОБЛ в период обострения и ремиссии приведены в таблице.

В группе пациентов с частыми обострениями БА и ХОБЛ уровень пресепсина оказался выше по сравнению с пациентами с редкими обострениями (580–2298 пкг/мл и 56–274 пкг/мл соответственно). В 17 % случаев у пациентов после купирования клинических проявлений обострения БА и ХОБЛ сохранялись высокие значения пресепсина, и эти пациенты дали очередное обострение в ближайшие 6 недель. Это позволило в дальнейшем, в ходе динамического наблюдения за 28 пациентами, перенесшими обострение, у которых оставались повышенные значения пресепсина, предупредить развитие очередного обострения назначением иммунореабилитации и препаратов метаболической терапии.

В период обострения существенно снижались показатели качества жизни и ОФВ1.

У пациентов с сопутствующей патологией сердечно-сосудистых заболеваний степень одышки была выше ($3,12 \pm 0,64$) по сравнению с пациентами без клинико-лабораторного и инструментального подтверждения ИБС ($1,98 \pm 0,74$); ОФВ1 соответственно – $52,44 \pm 4,22$ и $67,33 \pm 3,38$. В период инфекционного обострения БА и ХОБЛ отмечался нейтрофильный вариант воспаления дыхательных путей по результатам исследования индуцированной мокроты, что согласуется с уровнем выявленного дисбиоза дыхательных путей ($r = 0,68$ при $p < 0,05$). В период ремиссии у этих пациентов БА и ХОБЛ сохранялся нейтрофильный вариант воспаления. В ходе исследования установлено, что наиболее информативными биомаркерами тяжести обострения БА и ХОБЛ стали: уровни пресепсина и ЛИ, которые коррелируют между собой и появляются раньше, чем СРБ и прокальцитонин, уже в первые часы и дни обострения ($r = 0,62$ при $p < 0,05$). Кроме того,

5 пациентов, которые в период обострения имели наиболее высокие уровни пресепсина (2298 нг/мл) и низкий ЛИ (0,28), перенесли острую пневмонию, подтвержденную рентгенологически.

Показатель	В период обострения	В период ремиссии 1–6 мес.	Контроль
Оценка по опроснику ACQ (баллы)	3,87 (2,52–4,33) P < 0,01	3,00 (2,21–3,96) P < 0,01	0,1
Оценка одышки по шкале mMRC, баллы	2,01 (1,51–3,14) P < 0,05	1,09 (0,02–2,31) P < 0,01	0,0
Объем форсированного выдоха, в сек (л)	69,4 (43,30–71,22) P < 0,01	76,24 (69,90–81,44) P < 0,05	96,4 (92,20–100,76)
С-реактивный белок, мг/л	1,66 (1,18–2,48) P < 0,01	0,28 (0,20–1,18) P < 0,01	0,21 (0,11–0,26)
Пресепсин, пг/мл	497 (56–2298) P < 0,01	159 (48–189) P < 0,01	50–125
Прокальцитонин, пг/мл	2,9 (0,9–4,3) P < 0,01	1,66 (0,9–2,1) P < 0,01	0–0,7
Лейкоцитарный индекс	0,28 (0,41–0,55) P < 0,01	0,39 (0,44–0,71) P < 0,01	0,48 (0,39–0,52)
Содержание эозинофилов в мокроте, %	1,23 (0,1–2,1) P < 0,01	2,4 (0,9–3,6) P < 0,01	0,9 (1,1–1,8)
Содержание нейтрофилов в мокроте, %	55,82 (46,50–68,49) P < 0,01	32,1 (24,30–39,67) P < 0,01	22,71 (19,1–28,5)
Рост условно-патогенной флоры – дисбиоз 2–3-й степени слизистых дыхательных путей, %	69,0 (36,0–78,0) P < 0,01	47,0 (33,0–51,0) P < 0,01	6,0 (2,0–7,0) P < 0,01

В период ремиссии 2 пациента, которые сохраняли повышенный уровень пресепсина и низкие значения ЛИ, в ближайшие 3–6 недель дали новое обострение воспалительного процесса БА и ХОБЛ. Уровень прокальцитонина не коррелировал с тяжестью обострения ($r = 0,32$ при $p < 0,05$), появлялся на 1–2 суток позже. Уровень пресепсина имел корреляцию с тяжестью обо-

стрения ($r = 0,75$ при $p < 0,05$), и его значения были в 3–4 раза выше референтных значений. Корреляционный анализ показал высокую степень корреляции между показателями ЛИ и тяжестью обострения БА и ХОБЛ ($r = 0,70$, $p = 0,001$), высоким уровнем IgE и содержанием эозинофилов в мокроте больных atopической БА в сочетании с ХОБЛ ($r = 0,65$, $p = 0,003$). Низкая степень корреляции обнаружилась между уровнем СРБ и ЛИ ($r = 0,37$, $p = 0,005$).

Особый интерес представляет группа пациентов с дебютом бронхиальной астмы.

Уровни пресепсина и прокальцитонина в период обострения у всех пациентов были выше средних значений (159 ± 21 пкг/мл и $2,9 \pm 0,4$ пкг/мл соответственно). На фоне базисной терапии монтелукастом и флутиказоном пропионата контроль над симптомами бронхиальной астмы был установлен через 3–4 недели. Однако при анализе показателей цитокинового статуса выявлен дисбаланс в показателях провоспалительных цитокинов.

Уровень IL-1 β повышался до 45–50 пкг/мл и IL-6 до 90–105 пкг/мл, отмечено значительное снижение INF- γ (ДИ от 22,15 до 25,43 пкг/мл), что указывало на выраженность воспалительного аллергического процесса и требовало продолжения базисной терапии даже при отсутствии клинических симптомов БА. Особый интерес представляет динамика изменения значений IL-6 на фоне базисной терапии монтелукастом ($n = 4$) и флутиказоном пропионатом ($n = 6$), когда у 10 пациентов с дебютом БА оставались повышенными значения IL-6 с последующим снижением после трех месяцев терапии, но так и не достигших референтных значений. В развитии воспаления IL-6 может выполнять двойную роль. С одной стороны, он является типичным провоспалительным цитокином, с другой – может оказывать противовоспалительное действие, ограничивая выработку других провоспалительных цитокинов [19].

Уровень общего IgE составил $238,91 \pm 65,9$ МЕ/мл.

На фоне терапии монтелукастом и флутиказоном пропионатом установлено так же снижение частоты инфекционных обострений БА, более медленная нормализация маркеров воспаления, особенно IL-6.

Таким образом, была подтверждена прогностическая значимость пресепсина и провоспалительных цитокинов, их преимущество перед другими биомаркерами острого воспаления при инфекционных осложнениях верхних и нижних дыхательных путей у больных с БА и ХОБЛ.

*Технология внедрения полученных результатов
(алгоритм действия врача)*

Полученные результаты исследования позволили разработать алгоритм назначения антибактериальных препаратов и превентивной иммунореабилитации для пациентов с частыми инфекционными обострениями ХОБЛ и БА. Всем врачам-терапевтам БПНЦ РАН выданы рекомендации по ведению пациентов с частыми обострениями БА и ХОБЛ.

В осенний период пациентам БА и ХОБЛ ежегодно необходимо проводить профилактические прививки против гриппа и 1 раз в 3–5 лет вакцинацию против пневмококка.

Хорошо зарекомендовала себя вакцина «ГРИППОЛ-Плюс», которая дала хороший поствакцинальный иммунитет и не вызвала побочных проявлений у привитых.

Для профилактики пневмококковой пневмонии, за 1–2 месяца до сезонного подъема заболеваемости ОРВИ и гриппа, пациентам показана прививка – Пневмо-23 по схеме, рекомендуемой инструкцией к вакцине. В состав одной дозы вакцины Пневмо-23 входят капсульные очищенные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* двадцати трех серотипов, которые провоцируют тяжелое течение заболевания: 1–5 (включительно), 6В, 7F, 8, 9 (N и V), 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19 (А и F), 20, 22F, 23F и 33F.

В качестве дополнительного вещества – фенольный буферный раствор.

Способ введения: п/к или в/м; при первичной иммунизации – однократно вводят 0,5 мл. Ревакцинация – однократно 0,5 мл, не ранее чем через 3 года, за исключением лиц из группы повышенного риска или больных с иммунодепрессивной терапией.

Превентивная иммунопрофилактика ОРВИ и гриппа у пациентов с частыми инфекционными обострениями БА и ХОБЛ.

У пациентов со склонностью к лейкопении, анемии, с низкими показателями ЛИ рекомендуется проводить иммунопрофилактику пробиотиками, содержащими бифидобактерии, и фагами по аннотации с последующей вакцинопрофилактикой.

При показателях крови в пределах физиологических значений иммунопрофилактика проводится вакциной.

При лейкоцитозе, повышенных значениях ЛИ перед вакцинопрофилактикой необходимо провести профилактику полиоксидонием по аннотации.

При невыраженных клинических проявлениях инфекционного обострения БА и ХОБЛ и при низких значениях пресепсина ($<159 \pm 28$ нг/мл), незначительных отклонений значения ЛИ ($0,48 \pm 0,08$) – **антибактериальная терапия не требуется.**

При невыраженных клинических проявлениях инфекционного обострения БА, но повышенных значениях пресепсина ($>159 \pm 28$ нг/мл), низких значениях ЛИ ($<0,48 \pm 0,08$) – **антибактериальная терапия требуется.**

При сохраняющихся высоких значениях пресепсина ($>159 \pm 28$ нг/мл) и низких значениях ЛИ ($<0,48 \pm 0,08$) на 7–10 день лечения требуется продолжить **антибактериальную терапию и назначить по показаниям иммунотерапию (в/в иммуноглобулины)**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое распространение, частые обострения и тяжелые осложнения, несмотря на успехи в терапии заболеваний ХОБЛ и БА, ставят перед практическим здравоохранением задачу поиска ранних биомаркеров и разработки новых диагностических критериев для прогноза тяжелых осложнений заболеваний респираторного тракта. Изучение информативности биомаркеров ранней диагностики обострений в динамике и их роли в прогнозе тяжелых осложнений стало целью настоящего исследования. Показано, что пресепсин раньше, чем СРБ и прокальцитонин, появляется в сыворотке крови при инфекционном обострении ХОБЛ и БА, а сохранение повышенных значений этого показателя после купирования клинических признаков обострения, служит прогностическим признаком очередного обострения и требует срочной коррекции терапии. При вирусной этиологии обострения БА и ХОБЛ повышение пресепсина было незначительным по сравнению с обострением, вызванным бактериальной или вирусно-бактериальной флорой, что служило основанием отказа от антибактериальной терапии при значениях уровня пресепсина ниже $159,8 \pm 31,4$ пкг/мл. Кроме того, была выявлена прямая корреляция между уровнем пресепсина, ЛИ и тяжестью обострения. Показатели цитокинового статуса также указывали на активность аллергического воспаления. Особый интерес представляла динамика изменения значений IL-6, когда у 10 пациентов с дебютом БА оставались повышенными значения IL-6 длительное время, что указывало на двойной механизм действия этого цитокина. Данные последних исследований [20] по изучению механизмов врожденного иммунитета указывают на то, что и бактериальные антигены и аллергены через Toll-4 рецепторы запускают единый механизм продукции цитокинов в формировании воспалительных реакций, независимо от первоначального агента. Полученные предварительные результаты динамики изменений в цитокиновом статусе требуют дальнейшего изучения. Тем не менее исследования биомаркеров (пресепсина и провоспалительных цитокинов) и ЛИ дали возможность прогноза тяжелых осложнений уже в первые сутки поступления пациентов с обострениями заболеваний респираторного тракта и своевременного внесения коррективов в лечение.

Коллектив авторов выражает признательность сотрудникам «ДИАКОНА» за предоставленную возможность провести данное исследование

Конфликт интересов

Конфликт интересов авторами не заявлен.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Косякова Нинель Ивановна – доктор медицинских наук, заместитель главного врача по науке, зав. отделением иммунологии и аллергологии Больницы ПНЦ РАН;

Прохоренко Изабелла Рувимовна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины Института фундаментальных проблем биологии РАН;

Серов Дмитрий Александрович – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины Института фундаментальных проблем биологии РАН;

Радзюкевич Ярослав Вадимович – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины Института фундаментальных проблем биологии РАН;

Андреева Людмила Александровна – зав. бактериологической лабораторией БПНЦ РАН;

Панкратова Елена Витальевна – зав. клинико-диагностической лабораторией БПНЦ РАН;

Шибает Николай Викторович – зав. отделением функциональной диагностики БПНЦ РАН;

Сахаров Павел Алексеевич – врач-лаборант клинико-диагностической лаборатории БПНЦ РАН;

Кабанов Дмитрий Сергеевич – старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины Института фундаментальных проблем биологии РАН.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БА – бронхиальная астма
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
СРБ – С-реактивный белок
ЛИ – лимфоцитарный индекс интоксикации
ПЦР – полимеразная цепная реакция
CD14 – рецептор, опосредующий реакции на многие сигнальные вещества бактериальной клетки
sCD14 – секреторный рецептор, опосредующий реакции на многие сигнальные вещества бактериальной клетки
LPS – липополисахарид
LBP – белок, связывающий ЛПС
NF- α – фактор некроза опухоли-альфа
IL-6 – интерлейкин -6
IL-1 β – интерлейкин -1-бета
IL-1Ra – растворимый рецептор интерлейкина -1-альфа
IFN- γ – интерферон-гамма

ПЕРЕЧЕНЬ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ, ВЫСТУПЛЕНИЙ, НАЛИЧИЕ ПАТЕНТА ПО ТЕМЕ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ ЗА ПОСЛЕДНИЕ ТРИ ГОДА

Результаты исследования были доложены:

- на 25-м Национальном конгрессе по болезням органов дыхания и Диплом 1 степени – доклад «Клинико-иммунологические и молекулярно-микробиологические особенности обострений атопической бронхиальной астмы у детей», Москва, 2015 г.
- на 21-й Всероссийской научно-практической конференции «Качество лабораторных исследований – условие безопасности пациентов», Москва, 2016 г.
- на 26-м Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 2017 г.

В составе экспертов

1. Внебольничная пневмония у детей. Клинические рекомендации Российского респираторного общества, Межрегионального педиатрического респираторного общества, Федерации педиатров стран СНГ, Московского общества детских врачей. М., 2015. С. 61.
2. Косякова Н.И. Дисбиоз верхних дыхательных путей и инфекционные обострения атопической бронхиальной астмы.
3. Косякова Н.И., Прохоренко С.В., Андреева Л.А., Панкратова Е.В., Сахаров П.А. Роль пресепсина в прогнозе тяжести обострения при «OVERLAP SYNDROME».
4. Косякова Н.И. Вирус-индуцированная бронхиальная астма и роль герпетической инфекции в развитии бронхиальной обструкции у детей // Поликлиника. 2016. № 4. С. 49–55.
5. Косякова Н.И., Прохоренко С.В., Андреева Л.А., Панкратова Е.В., Сахаров П.А. Пресепсин – маркер прогноза тяжести инфекционных обострений бронхиальной астмы и ХОБЛ // Справочник заведующего КДЛ. 2016. № 8. С. 33–42.
6. Косякова Н.И., Прохоренко С.В., Андреева Л.А., Панкратова Е.В., Сахаров П.А. Поиск новых биомаркеров инфекционного обострения атопической бронхиальной астмы // Медицинская иммунология. Материалы 26 научного форума «Дни иммунологии в С.-Петербурге». 2017. С. 89–90.
7. Кабанов Д.С., Серов Д.А., Зубова С.В., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Динамика подавления эффектов эндотоксинов липополисахаридом из *Rhodobacter capsulatus* PG // Биохимия. 2016. № 81 (3). С. 401–409.

8. Зубова С.В., Кабанов Д.С., Серов Д.А., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Артефакты, возникающие при использовании буфера, блокирующего Fc-рецепторы лейкоцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. № 162 (8). С. 210–214.

9. Прохоренко И.Р., Грачев С.В., Зубова С.В., Кабанов Д.С. Средство для дифференцировки моноцитоподобных клеток. Патент на изобретение № 2590696. Опубликовано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 10.07.2016.

10. Косякова Н.И., Прохоренко С.В., Андреева Л.А., Панкратова Е.В., Сахаров П.А. Поиск новых биомаркеров инфекционных обострений атопической бронхиальной астмы // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. Спец. выпуск – 26. Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в С.-Петербурге». С. 89–90.

11. Серов Д.А., Радзюкевич Я.В., Косякова Н.И., Прохоренко И.Р. Исследование ответных реакций клеток крови пациентов с дебютом бронхиальной астмы // Медицинская иммунология. Спец. выпуск. Материалы 26 научного форума «Дни иммунологии в С.-Петербурге». 2017. С. 96–97.

12. Радзюкевич Я.В., Серов Д.А., Косякова Н.И., Прохоренко И.Р. Влияние терапии бронхиальной астмы на ЛПС-индуцированные цитокиновые ответы клеток крови пациентов с данным заболеванием. Материалы 21-й Международной школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». 2017. С. 236–237.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чучалин А.Г. Клинические рекомендации: Пульмонология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 240 с.
2. Reddel H.K., Taylor D.R., Bateman E.D. et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice // *Am J Respir Crit Care Med*. 2009. No. 180. P. 59–99.
3. Чучалин А.Г. Пульмонология: Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 800 с.
4. Белевский А.С. Синдром перекреста бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких // *Практическая пульмонология*. 2014. № 2. С. 12–19.
5. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н. Системное воспаление – миф или реальность? // *Вестник Российской академии наук*. 2004. Т. 74. № 3. С. 219–227.
6. Agusti A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease: what we know and what we don't know (but should) // *Proc Am Thorac Soc*. 2007. No. 4. P. 522–525.
7. Franciosi L.G., Page C.P., Celli B.R. Markers of disease severity in chronic obstructive pulmonary disease // *Pulm Pharmacol Ther*. 2006. No. 19. P. 189–199.
8. Еремина Н.А, Ткаля Н.Г., Воронина Н.А и сотр. Динамика пресепсина при антибактериальной терапии муковисцидоза на стадии обострения обструктивного слизисто-гнойного бронхита. Клинический случай // *Лаборатория*. 2014. № 2. С. 25.
9. Naitoh K., Shirakawa K., Hirose J., Nakamura M., Takeuchi T., Hosaka Y., Furusako S. The new sepsis marker, sCD14-ST (PRESEPSIN), induction mechanism in the rabbit sepsis models // *Sepsis*. 2010. P. 19.
10. Carpintero R., Brandt K., Gruaz L., and Burger D. Interleukin-1 β production in human monocytes/macrophages is differentially regulated by Mek1 upon sterile and infectious inflammatory conditions, *SOJ Immunol*. 2014. No. 2. <http://dx.doi.org/10.15226/soji.2014.00109>.
11. Cassatella M.A., Guasparri I., Ceska M., Bazzoni F., and Rossi F. Interferon-gamma inhibits interleukin-8 production by human polymorphonuclear leucocytes // *Immunol*. 1993. No. 78. P. 177–184.
12. Barnes P.J. The Cytokine Network in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2009. No. 41. P. 631–638.
13. Di Stefano A., Caramori G., Capelli A., Gnemmi I., Ricciardolo F., Oates T., Donner C.F., Chung K.F., Barnes P.J., Adcock I.M. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Eur Respir J* 2004. No. 24. P. 78–85.
14. Traves S.L., Donnelly LE. Th17 cells in airway diseases // *Curr Mol Med* 2008. No. 8. P. 416–426.

-
15. Di Stefano A., Caramori G., Gnemmi I., Contoli M., Vicari C., Capelli A., Magno F., D'Anna S.E., Zanini A., Brun P. et al. T helper type 17– related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients // Clin Exp Immunol 2009. No. 157. P. 316–324.
 16. Болдина М.В., Постникова Л.Б., Кубышева Н.И., Соодаева С.К. Участие провоспалительных цитокинов IL-17 и TNF-альфа в развитии нарушений легочной и внутрисердечной гемодинамики при хронической обструктивной болезни легких // Пульмонология 2014. № 1. С. 31–37.
 17. Островский В.К., Мащенко А.В., Янголенко Д.В., Макаров С.В. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях // Клини. лаб. диагностика. 2006. № 6. С. 50–53.
 18. Paggiaro P.L., Chanez P., Holz O. et al. Sputum induction // Eur. Respir. J. 2002. No. 22 (Suppl. 37). P. 3–8.
 19. Ярилин А.А. Иммунология. 2010. № 752. С. 251–273.
 20. Trompette et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a toll-like receptor complex protein // Nature. 2015. No. 457 (7229). P. 585–588.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Общий вид плашки для ИФА после остановки развития хромогенной реакции с ТМБ

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Результаты измерений представлены в приложениях А, Б, В, Г, Д.

Приложение А

Результаты измерения концентраций TNF- α в пробах после 6 ч инкубации

1A-6	13	-0.008	-0.007	0.0	K_4	1A-6
1B-6	14	0.151				1B-6
1C-6	15	0.157	0.154	35.6	$K_4 + E_c$	1C-6
1D-6	16	0.003				1D-6
1E-6	17	-0.006	-0.004	0.0	K_4	1E-6
1F-6	18	0.351				1F-6
1G-6	19	0.371	0.361	61.8	$K_4 + E_c$	1G-6
1H-6	20	-0.009				1H-6
1A-7	17	-0.007	-0.008	0.0	K_5	1A-7
1B-7	18	0.052				1B-7
1C-7	19	0.053	0.053	13.6	$K_5 + E_c$	1C-7
1D-7	20	-0.012				1D-7
1E-7	21	-0.011	-0.011	0.0	K_5	1E-7
1F-7	22	0.009				1F-7
1G-7	23	0.002	0.006	22.2	$K_5 + E_c$	1G-7
1H-7	24	0.024				1H-7
1A-8	21	0.023	0.024	5.7	K_6	1A-8
1B-8	22	0.442				1B-8
1C-8	23	0.419	0.430	103.6	$K_6 + E_c$	1C-8
1D-8	24	-0.008				1D-8
1E-8	25	-0.010	-0.009	0.0	K_6	1E-8
1F-8	26	0.551				1F-8
1G-8	27	0.570	0.561	143.4	$K_6 + E_c$	1G-8
1H-8	28	-0.010				1H-8
1A-9	25	-0.008	-0.009	0.0	K_7	1A-9
1B-9	26	0.007				1B-9
1C-9	27	0.014	0.010	2.9	$K_7 + E_c$	1C-9
1D-9	28	-0.010				1D-9
1E-9	29	-0.010	-0.010	0.0	K_7	1E-9
1F-9	30	0.233				1F-9
1G-9	31	0.243	0.238	51.1	$K_7 + E_c$	1G-9
1H-9	32	-0.010				1H-9
1A-10	29	-0.008	-0.009	0.0	K_8	1A-10
1B-10	30	0.077				1B-10
1C-10	31	0.079	0.078	20.2	$K_8 + E_c$	1C-10
1D-10	32	-0.004				1D-10
1E-10	33	-0.010	-0.007	0.0	K_8	1E-10
1F-10	34	0.274				1F-10
1G-10	35	0.220	0.247	52.8	$K_8 + E_c$	1G-10
1H-10	36	-0.017				1H-10
1A-11	33	-0.011	-0.014	0.0	K_9	1A-11
1B-11	34	0.164				1B-11
1C-11	35	0.181	0.172	39.0	$K_9 + E_c$	1C-11
1D-11	36	-0.016				1D-11
1E-11	37	-0.015	-0.015	0.0	K_9	1E-11
1F-11	38	0.464				1F-11
1G-11	39	0.478	0.471	116.4	$K_9 + E_c$	1G-11
1H-11	40	0.023				1H-11
1A-12	37	0.031	0.027	6.6	K_{10}	1A-12
1B-12	38	0.233				1B-12
1C-12	39	0.219	0.226	48.9	$K_{10} + E_c$	1C-12
1D-12	40	-0.006				1D-12
1E-12	41	-0.007	-0.006	0.0	K_{10}	1E-12
1F-12	42	0.326				1F-12
1G-12	43	0.313	0.321	69.1	$K_{10} + E_c$	1G-12
1H-12	44	0.042				1H-12

End of Run

Приложение Б

Результаты измерения концентраций IL-6 в пробах после 6 ч инкубации

1A-5	9	0.042	0.042	17.4	Максоров го	1A-5
1B-5		1.849				1B-5
1C-5	10	1.849	1.849	1920	го + АПС	1C-5
1D-5		0.028				1D-5
1E-5	11	0.027	0.027	5.9	Максоров, через 2 нед	1E-5
1F-5		2.574				1F-5
1G-5	12	2.540	2.557	2699	через 2 нед + АПС	1G-5
1H-5		0.038				1H-5
1A-6	13	0.037	0.038	13.8	Ревина го	1A-6
1B-6		1.522				1B-6
1C-6	14	1.530	1.526	1576	го + АПС	1C-6
1D-6		0.026				1D-6
1E-6	15	0.028	0.027	5.4	Ревина, через 2 нед	1E-6
1F-6		2.374				1F-6
1G-6	16	2.611	2.492	2629	через 2 нед + АПС	1G-6
1H-6		0.023				1H-6
1A-7	17	0.023	0.023	2.2	Лозовая го	1A-7
1B-7		0.999				1B-7
1C-7	18	0.936	0.917	912.7	го + АПС	1C-7
1D-7		0.021				1D-7
1E-7	19	0.020	0.020	0.2	Лозовая, через 2 нед	1E-7
1F-7		1.290				1F-7
1G-7	20	1.265	1.278	1305	через 2 нед + АПС	1G-7
1H-7		0.253				1H-7
1A-8	21	0.278	0.265	200.5	Мельникова го	1A-8
1B-8		2.654				1B-8
1C-8	22	2.637	2.645	2795	го + АПС	1C-8
1D-8		0.038				1D-8
1E-8	23	0.037	0.037	15.6	Мельникова, через 2 нед	1E-8
1F-8		2.707				1F-8
1G-8	24	2.717	2.712	2868	через 2 нед + АПС	1G-8
1H-8		0.114				1H-8
1A-9	25	0.122	0.118	79.1	Ворожова го	1A-9
1B-9		2.322				1B-9
1C-9	26	2.274	2.298	2411	го + АПС	1C-9
1D-9		0.030				1D-9
1E-9	27	0.031	0.030	0.1	Ворожова, через 2 нед	1E-9
1F-9		1.735				1F-9
1G-9	28	1.731	1.743	1811	через 2 нед + АПС	1G-9
1H-9		0.029				1H-9
1A-10	29	0.028	0.028	6.6	Мельникова го	1A-10
1B-10		1.288				1B-10
1C-10	30	1.280	1.244	1269	го + АПС	1C-10
1D-10		0.030				1D-10
1E-10	31	0.029	0.029	7.5	Мельникова, через 2 нед	1E-10
1F-10		1.907				1F-10
1G-10	32	1.929	1.918	2003	через 2 нед + АПС	1G-10
1H-10		0.024				1H-10
1A-11	33	0.024	0.024	3.2	Полынова го	1A-11
1B-11		1.938				1B-11
1C-11	34	1.991	1.965	2054	го + АПС	1C-11
1D-11		0.022				1D-11
1E-11	35	0.022	0.022	1.7	Полынова, через 2 нед	1E-11
1F-11		2.735				1F-11
1G-11	36	2.701	2.718	2074	через 2 нед + АПС	1G-11
1H-11		0.473				1H-11
1A-12	37	0.491	0.402	439.2	Мельникова го	1A-12
1B-12		2.719				1B-12
1C-12	38	2.703	2.711	2867	го + АПС	1C-12
1D-12		0.022				1D-12
1E-12	39	0.023	0.023	2.1	Через 2 нед Мельникова	1E-12
1F-12		2.490				1F-12
1G-12	40	2.543	2.517	2655	через 2 нед + АПС	1G-12
1H-12		0.023				1H-12

End of Run
Test Ended

Результаты измерения концентраций IL-1 β в пробах после 24 ч инкубации

1A-4	5	0.830	0.830	0.6	K2		1A-4
1B-4		0.796					1B-4
1C-4	6	0.739	0.768	900.6	K2 E. coli	} go	1C-4
1D-4		0.830					1D-4
1E-4	7	0.829	0.830	0.6	K2		1E-4
1F-4		0.581					1F-4
1G-4	8	0.612	0.597	690.3	K2 E. coli	} nocuo	1G-4
1H-4		0.831					1H-4
1A-5	9	0.830	0.830	1.2	K3		1A-5
1B-5		0.192					1B-5
1C-5	10	0.316	0.254	271.2	K3 E. coli	} go	1C-5
1D-5		0.826					1D-5
1E-5	11	0.826	0.827	0.8	K3		1E-5
1F-5		0.279					1F-5
1G-5	12	0.261	0.278	290.3	K3 E. coli	} nocuo	1G-5
1H-5		0.830					1H-5
1A-6	13	0.832	0.831	1.8	K4		1A-6
1B-6		0.231					1B-6
1C-6	14	0.217	0.224	234.8	K4 E. coli	} go	1C-6
1D-6		0.829					1D-6
1E-6	15	0.831	0.830	1.2	K4		1E-6
1F-6		0.372					1F-6
1G-6	16	0.426	0.399	448.9	K4 E. coli	} nocuo	1G-6
1H-6		0.830					1H-6
1A-7	17	0.831	0.830	1.3	K5		1A-7
1B-7		0.845					1B-7
1C-7	18	0.844	0.844	15.3	K5 E. coli	} go	1C-7
1D-7		0.828					1D-7
1E-7	19	0.828	0.828	0.8	K5		1E-7
1F-7		0.881					1F-7
1G-7	20	0.881	0.881	59.4	K5 E. coli	} nocuo	1G-7
1H-7		0.848					1H-7
1A-8	21	0.830	0.835	5.8	K6		1A-8
1B-8		0.565					1B-8
1C-8	22	0.527	0.546	628.5	K6 E. coli	} go	1C-8
1D-8		0.829					1D-8
1E-8	23	0.832	0.830	1.3	K6		1E-8
1F-8		0.335					1F-8
1G-8	24	0.319	0.327	368.8	K6 E. coli	} nocuo	1G-8
1H-8		0.831					1H-8
1A-9	25	0.830	0.830	1.4	K7		1A-9
1B-9		0.252					1B-9
1C-9	26	0.255	0.254	278.8	K7 E. coli	} go	1C-9
1D-9		0.829					1D-9
1E-9	27	0.827	0.828	0.8	K7		1E-9
1F-9		0.264					1F-9
1G-9	28	0.274	0.269	298.8	K7 E. coli	} nocuo	1G-9
1H-9		0.831					1H-9
1A-10	29	0.829	0.830	0.9	K8		1A-10
1B-10		0.183					1B-10
1C-10	30	0.189	0.181	83.5	K8 E. coli	} go	1C-10
1D-10		0.830					1D-10
1E-10	31	0.830	0.830	0.8	K8		1E-10
1F-10		0.228					1F-10
1G-10	32	0.230	0.229	248.5	K8 E. coli	} nocuo	1G-10
1H-10		0.834					1H-10
1A-11	33	0.832	0.833	3.8	K9		1A-11
1B-11		0.163					1B-11
1C-11	34	0.177	0.178	167.9	K9 E. coli	} go	1C-11
1D-11		0.831					1D-11
1E-11	35	0.839	0.830	1.4	K9		1E-11
1F-11		0.622					1F-11
1G-11	36	0.633	0.638	141.2	K9 E. coli	} nocuo	1G-11
1H-11		0.847					1H-11
1A-12	37	0.841	0.844	15.8	K10		1A-12

Приложение Г

Результаты измерения концентраций IL-1Ra в пробах после 24 ч инкубации

1A-5	10	0.087	0.092	344.0	K3	} go	1A-5
1B-5		-0.005					1B-5
1C-5	11	-0.005	-0.005	4.6	K3 E.coli		1C-5
1D-5		0.070				} noise	1D-5
1E-5	12	0.054	0.062	257.8	K3		1E-5
1F-5		-0.007					1F-5
1G-5	13	-0.009	-0.008	0.0	K3 E.coli	} noise	1G-5
1H-5		0.036					1H-5
1A-6	14	0.043	0.039	101.1	K4		} go
1B-6		-0.007				1B-6	
1C-6	15	-0.007	-0.007	0.0	K4 E.coli	1C-6	
1D-6		0.040				} noise	1D-6
1E-6	16	0.034	0.037	173.1	K4		1E-6
1F-6		-0.010					1F-6
1G-6	17	-0.011	-0.010	0.0	K4 E.coli	} noise	1G-6
1H-6		0.022					1H-6
1A-7	18	0.034	0.028	140.2	K5		} go
1B-7		0.000				1B-7	
1C-7	19	-0.001	-0.000	23.5	K5 E.coli	1C-7	
1D-7		0.062				} noise	1D-7
1E-7	20	0.062	0.062	258.7	K5		1E-7
1F-7		0.014					1F-7
1G-7	21	0.013	0.014	82.9	K5 E.coli	} noise	1G-7
1H-7		0.073					1H-7
1A-8	22	0.067	0.070	204.4	K6		} go
1B-8		0.011				1B-8	
1C-8	23	0.010	0.010	70.1	K6 E.coli	1C-8	
1D-8		0.069				} noise	1D-8
1E-8	24	0.059	0.064	255.8	K6		1E-8
1F-8		0.017					1F-8
1G-8	25	0.023	0.020	109.0	K6 E.coli	} noise	1G-8
1H-8		0.100					1H-8
1A-9	26	0.101	0.100	364.6	K7		} go
1B-9		-0.002				1B-9	
1C-9	27	-0.004	-0.003	12.2	K7 E.coli	1C-9	
1D-9		0.053				} noise	1D-9
1E-9	28	0.054	0.054	229.6	K7		1E-9
1F-9		0.010					1F-9
1G-9	29	0.012	0.011	72.7	K7 E.coli	} noise	1G-9
1H-9		0.048					1H-9
1A-10	30	0.052	0.050	217.8	K8		} go
1B-10		0.014				1B-10	
1C-10	31	0.010	0.012	75.2	K8 E.coli	1C-10	
1D-10		0.056				} noise	1D-10
1E-10	32	0.064	0.060	250.2	K8		1E-10
1F-10		0.004					1F-10
1G-10	33	0.004	0.004	44.5	K8 E.coli	} noise	1G-10
1H-10		0.052					1H-10
1A-11	34	0.050	0.055	233.0	K9		} go
1B-11		0.001				1B-11	
1C-11	35	0.000	0.001	29.6	K9 E.coli	1C-11	
1D-11		0.057				} noise	1D-11
1E-11	36	0.064	0.060	252.3	K9		1E-11
1F-11		0.026					1F-11
1G-11	37	0.018	0.022	117.2	K9 E.coli	} noise	1G-11
1H-11		0.128					1H-11
1A-12	38	0.137	0.132	445.0	K10		} go
1B-12		0.005				1B-12	
1C-12	39	0.003	0.004	43.5	K10 E.coli	1C-12	
1D-12		0.090				} noise	1D-12
1E-12	40	0.111	0.104	374.0	K10		1E-12
1F-12		0.029					1F-12
1G-12	41	0.024	0.027	136.1	K10 E.coli	} noise	1G-12
1H-12		0.029					1H-12

End of Run

Приложение Д

Результаты измерения концентраций IFN-γ в пробах после 24 ч инкубации

1A-5	9	-0.019	-0.021	0.0 K3		1A-5
1B-5		-0.023				1B-5
1C-5	10	-0.018	-0.020	0.0 K3 E.coli	go	1C-5
1D-5		-0.021				1D-5
1E-5	11	-0.021	-0.021	0.0 K3		1E-5
1F-5		-0.014				1F-5
1G-5	12	-0.012	-0.013	1.4 K3 E.coli	nosco	1G-5
1H-5		-0.019				1H-5
1A-6	13	-0.021	-0.020	0.0 K4		1A-6
1B-6		-0.021				1B-6
1C-6	14	-0.019	-0.020	0.0 K4 E.coli	go	1C-6
1D-6		-0.021				1D-6
1E-6	15	-0.015	-0.018	0.0 K4		1E-6
1F-6		-0.009				1F-6
1G-6	16	-0.005	-0.007	0.0 K4 E.coli	nosco	1G-6
1H-6		-0.008				1H-6
1A-7	17	-0.005	-0.007	0.2 K5		1A-7
1B-7		-0.013				1B-7
1C-7	18	-0.015	-0.014	0.5 K5 E.coli	go	1C-7
1D-7		-0.016				1D-7
1E-7	19	-0.018	-0.017	0.0 K5		1E-7
1F-7		-0.015				1F-7
1G-7	20	-0.018	-0.017	0.0 K5 E.coli	nosco	1G-7
1H-7		-0.019				1H-7
1A-8	21	-0.021	-0.020	0.0 K6		1A-8
1B-8		-0.016				1B-8
1C-8	22	-0.015	-0.016	0.0 K6 E.coli	go	1C-8
1D-8		-0.013				1D-8
1E-8	23	-0.019	-0.016	0.0 K6		1E-8
1F-8		-0.020				1F-8
1G-8	24	-0.007	-0.014	1.0 K6 E.coli	nosco	1G-8
1H-8		-0.012				1H-8
1A-9	25	-0.014	-0.013	1.6 K7		1A-9
1B-9		-0.017				1B-9
1C-9	26	-0.012	-0.015	0.0 K7 E.coli	go	1C-9
1D-9		-0.014				1D-9
1E-9	27	-0.009	-0.011	3.2 K7		1E-9
1F-9		-0.013				1F-9
1G-9	28	-0.015	-0.014	0.9 K7 E.coli	nosco	1G-9
1H-9		-0.019				1H-9
1A-10	29	-0.021	-0.020	0.0 K8		1A-10
1B-10		-0.018				1B-10
1C-10	30	-0.019	-0.018	0.0 K8 E.coli	go	1C-10
1D-10		-0.017				1D-10
1E-10	31	-0.024	-0.021	0.0 K8		1E-10
1F-10		-0.018				1F-10
1G-10	32	-0.013	-0.015	0.0 K8 E.coli	nosco	1G-10
1H-10		-0.014				1H-10
1A-11	33	-0.019	-0.017	0.0 K9		1A-11
1B-11		-0.020				1B-11
1C-11	34	-0.015	-0.017	0.0 K9 E.coli	go	1C-11
1D-11		-0.020				1D-11
1E-11	35	-0.021	-0.020	0.0 K9		1E-11
1F-11		-0.007				1F-11
1G-11	36	-0.007	-0.007	7.7 K9 E.coli	nosco	1G-11
1H-11		-0.013				1H-11
1A-12	37	-0.017	-0.015	0.0 K10		1A-12
1B-12		-0.008				1B-12
1C-12	38	-0.014	-0.011	3.5 K10 E.coli	go	1C-12
1D-12		-0.016				1D-12
1E-12	39	-0.018	-0.017	0.0 K10		1E-12
1F-12		-0.014				1F-12
1G-12	40	-0.013	-0.014	1.0 K10 E.coli	nosco	1G-12
1H-12		0.005				1H-12

End of Run

Научное издание

Косякова Нинель Ивановна,
Прохоренко Изабелла Рувимовна,
Серов Дмитрий Александрович,
Радзюкевич Ярослав Вадимович,
Андреева Людмила Александровна,
Панкратова Елена Витальевна,
Шибает Николай Викторович,
Сахаров Павел Алексеевич,
Кабанов Дмитрий Сергеевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРОТЫ И КРОВИ
НА БИОМАРКЕРЫ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ
И ОЦЕНКА РОЛИ ПРЕСЕПСИНА,
РЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ И ЦИТОКИНОВ
В ПРОГНОЗЕ ОБОСТРЕНИЙ
И ТЯЖЕЛЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ
ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ**

Методические рекомендации
по внедрению результатов научно-поисковой работы

Технический редактор Доронкина Е.Н.

Подписано в печать 30.04.2021.

Бумага офсетная.

Гарнитура Times New Roman.

Формат 60×84 1/8.

Печать трафаретная. Печ. л. 4,2.

Тираж 500 экз. Заказ № 017-21.

Отпечатано в типографии ИД «Академия Естествознания»,
440026, г. Пенза, ул. Лермонтова, 3