

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Макарова Екатерина Вадимовна

**КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ,
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И
ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРАПИИ
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

14. 01. 04 – Внутренние болезни

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

НАУЧНЫЕ КОНСУЛЬТАНТЫ:

доктор медицинских наук,
профессор Г.Н.Варварина

доктор биологических наук,
профессор В.В.Новиков

Нижний Новгород – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ ПЕРСИСТЕНЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ И ВОЗМОЖНОСТЯХ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	17
1.1. Хроническая обструктивная болезнь легких: обзор заболевания в свете современных представлений.....	17
1.2. Воспаление как основа патогенеза хронической обструктивной болезни легких.....	24
1.2.1. Клетки, реализующие воспаление при хронической обструктивной болезни легких.....	26
1.2.2. Растворимые формы мембранных антигенов лейкоцитов и их роль в генезе воспаления при хронической обструктивной болезни легких.....	35
1.3. Роль инфекции в патогенезе хронической обструктивной болезни легких.....	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	64
2.1. Дизайн исследования.....	64
2.2. Исходные характеристики больных.....	72
2.3. Методы исследования.....	78
2.4. Статистическая обработка результатов.....	85
ГЛАВА 3. КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ И СОСТОЯНИЕ МАРКЕРОВ ИММУНИТЕТА.....	87
3.1. Содержание растворимых дифференцировочных антигенов лейкоцитов и молекул гистосовместимости в зависимости от степени тяжести, фенотипа и частоты обострений хронической обструктивной болезни легких	87

3.2. Особенности содержания иммунных биомаркеров и их связь с клинико-функциональными характеристиками больных по результатам кластерного анализа.....	98
3.3. Изменения содержания иммунных маркеров при обострении хронической обструктивной болезни легких.....	107
3.4. Обсуждение результатов.....	110
ГЛАВА 4. СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ, ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ И ПЕРСИСТЕНЦИИ БАКТЕРИЙ.....	118
4.1. Оценка микробного пейзажа респираторного тракта при хронической обструктивной болезни легких.....	118
4.2. Определение антибиотикорезистентности выделенных бактерий.....	125
4.3. Определение факторов патогенности и персистенции выделенных бактерий	128
4.4. Обсуждение результатов.....	146
ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ, МАРКЕРАМИ ИММУННОГО ОТВЕТА БОЛЬНЫХ И ОСОБЕННОСТЯМИ РЕСПИРАТОРНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ.....	152
5.1. Корреляционные связи между клинико-анамнестическими, функциональными характеристиками больных и микробной нагрузкой.....	152
5.2. Корреляционные связи между клинико-функциональными характеристиками и маркерами иммунного ответа пациентов.....	154
5.3. Корреляционные связи клинико-функциональных и иммунологических характеристик больных с персистентными свойствами выделенных у них бактерий	159

ГЛАВА 6. ИЗМЕНЕНИЯ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ И БИОМАРКЕРОВ СОСТОЯНИЯ ИММУНИТЕТА ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ.....	168
6.1. Влияние дополнительной терапии рофлумаилом на частоту обострений, функциональные параметры и содержание растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток при хронической обструктивной болезни легких.....	168
6.2. Изменения клиничко-функциональных параметров и сывороточного содержания иммунных биомаркеров при лечении обострений хронической обструктивной болезни легких.....	176
6.2.1. Влияние небулизированного будесонида на клиничко-функциональные параметры и сывороточное содержание растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов при обострении хронической обструктивной болезни легких.....	176
6.2.2. Влияние неинвазивной механической вентиляции легких на клиничко-функциональные параметры и сывороточное содержание растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов при обострении хронической обструктивной болезни легких, осложненном острой дыхательной недостаточностью.....	185
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	192
ВЫВОДЫ.....	209
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	212
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	214

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИгА – антииммуноглобулиновая активность

АЛА – антилизоцимная активность

АЛфА – антилактоферриновая активность

БА – бронхиальная астма

ВДП – верхние дыхательные пути

ГБУЗ НО – Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Нижегородской области

ДДАХ – антихолинэргические препараты длительного действия

ДДБА – длительно действующие β 2-агонисты

е.а. – единицы активности

ед. ОП – единицы оптической плотности

ЖЕЛ – жизненная емкость легких

иГК – ингаляционные глюкокортикоиды

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН- γ – интерферон- γ

МКА – моноклональные антитела

ММП – матриксная металлопротеаза

МОС25 – максимальная объемная скорость выдоха на уровне 25% ФЖЕЛ

МОС50 – максимальная объемная скорость выдоха на уровне 50% ФЖЕЛ

МОС75 – максимальная объемная скорость выдоха на уровне 75% ФЖЕЛ

НВЛ – неинвазивная вентиляция легких

н.д. – нет данных

НДП – нижние дыхательные пути

ОДА – однофакторный дисперсионный анализ

ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1 секунду

ПОС – пиковая объемная скорость выдоха

РИД – радиальная иммунодиффузия

сГК – системные глюкокортикоиды

СОС25-75 - средняя объемная скорость середины выдоха между 25% и 75%

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

усл.ед. – условные единицы

ФВД – функция внешнего дыхания

ФДЭ – фосфодиэстераза

ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ATS – Американское торакальное общество

САТ-тест – COPD Assesment Test, оценочный тест ХОБЛ

CD – кластер дифференцировки

Conf. Interval – Confidential Interval, доверительный интервал

DALY – Disability-adjusted life year, годы жизни, скорректированные по нетрудоспособности

ERS – Европейское респираторное общество

F – критерий Фишера

GARD – Глобальный Альянс по борьбе с хроническими респираторными заболеваниями

GINA – Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы

GOLD – Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких

HLA – Human Leukocyte Antigens, человеческий лейкоцитарный антиген

ICAM – молекулы межклеточной адгезии

Ig – иммуноглобулин

IL – интерлейкин

LFA-1 – Lymphocyte function-associated antigen 1

M – средняя величина

Me [25p;75p] – медиана и 25, 75 перцентили

MHC – главный комплекс гистосовместимости

MRC – Medical Research Council, Медицинский исследовательский совет

n.s. – not significant, не достоверно

p – вероятность ошибочного отклонения нулевой гипотезы

r – коэффициент корреляции Спирмена

sCD – растворимая форма дифференцировочных молекул

SD – стандартное отклонение

SE – стандартная ошибка среднего

SpO₂ – сатурации кислорода

Th1 – Т-хелперы 1-го типа

Th17 – Т-хелперы 17

Th2 – Т-хелперы 2-го типа

TNF- α – фактор некроза опухоли- α

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) относится к числу широко распространенных заболеваний внутренних органов, с тенденцией к росту заболеваемости и смертности, которая составляет почти 6% всех случаев смерти в мире [282]. ХОБЛ значительно снижает качество жизни пациентов, является одной из основных причин инвалидности, плохо поддается лечению [3, 104, 248]. В основе патогенеза ХОБЛ лежит хроническое воспаление дыхательных путей и легочной ткани [139, 184], в поддержании которого важную роль играют нарушения механизмов иммунной защиты [72,204] и бактериальная колонизация респираторного тракта [144, 317].

В последние годы меняются представления о микробиоценозе дыхательных путей у больных ХОБЛ. В качестве этиологических факторов заболеваний дыхательных путей нередко рассматриваются не только основные респираторные патогены, но и условно-патогенные бактерии [75], способные вызывать острые или хронические процессы у лиц со сниженным иммунным статусом. В настоящее время большое внимание уделяется изучению механизмов патогенности и персистенции возбудителей, которые обеспечивают устойчивость к агрессивным физико-химическим факторам макроорганизма и его биологическим защитным системам [18, 74].

Поддержанию хронического воспаления в дыхательных путях способствуют нарушения местной и общей иммунореактивности [57, 101, 301], вызванные действием повреждающих факторов и индуцированного ими оксидативного стресса [119]. С позиций реальной клинической практики дальнейшее развитие этого направления связано с поиском биологических маркеров, отражающих состояние иммунной системы и имеющих диагностическую и прогностическую значимость. В качестве таких методов иммунологического мониторинга могут рассматриваться растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной

системы [42, 266], которые являются важными участниками межклеточных взаимодействий и обладают иммунорегуляторными свойствами [83, 250].

Мембранные и растворимые формы дифференцировочных лейкоцитарных антигенов изучались при различной патологии, в том числе при заболеваниях органов дыхания [29, 63, 66, 238, 266], однако данные, касающиеся больных ХОБЛ, немногочисленны и противоречивы, не исследовано влияние фенотипа и особенностей течения ХОБЛ на пул иммунных маркеров. Также в настоящее время представлены лишь единичные работы, посвященные анализу факторов, способствующих персистенции условно-патогенных бактерий при хронических бронхолегочных заболеваниях [52, 149]; не доказана их роль в прогрессировании заболевания. Детальной проработки требуют различные аспекты взаимоотношений между микрофлорой и макроорганизмом в патогенезе ХОБЛ. С учетом этого комплексное изучение биомаркеров, характеризующих процессы адгезии, дифференцировки, активации и апоптоза клеток, в их взаимосвязи с персистентными свойствами возбудителей в составе микробиоценоза респираторного тракта, может внести вклад в понимание механизмов нарушения колонизационной резистентности и персистенции воспалительного процесса при ХОБЛ и представляет перспективное и актуальное направление.

Существенное влияние на качество жизни, прогрессирование и летальность оказывают обострения ХОБЛ, характеризующиеся максимальной активностью воспаления [24, 248]. Профилактике и лечению обострений ХОБЛ придается сегодня особое значение [7, 131]. Использование иммунологического подхода позволит научно обосновать современные методы медикаментозной и немедикаментозной терапии ХОБЛ, всесторонне оценить их эффективность, безопасность и иммуномодулирующее действие, поможет оптимизировать и персонализировать лечение больных.

Цель исследования. Изучить особенности течения хронической обструктивной болезни легких в зависимости от состояния иммунного ответа и

микробиоценоза респираторного тракта; оценить клинико-функциональные и иммуномодулирующие эффекты терапии.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать сывороточное содержание растворимых форм лейкоцитарных антигенов CD38, CD25, CD50, CD54, CD14, CD16, CD8, CD95 и молекул гистосовместимости в зависимости от клинических особенностей ХОБЛ (фенотипа заболевания и частоты обострений).

2. Изучить изменения сывороточного уровня растворимых дифференцировочных молекул при прогрессировании бронхообструктивных нарушений у больных ХОБЛ.

3. Оценить влияние фазы заболевания на содержание растворимых форм лейкоцитарных дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости у больных ХОБЛ.

4. Дать характеристику состояния микробиоценоза слизистых оболочек различных отделов респираторного тракта при стабильной ХОБЛ.

5. Выявить особенности микробиоценоза слизистых оболочек нижних дыхательных путей при разной тяжести бронхообструктивных нарушений у больных ХОБЛ.

6. Оценить биологические патогенные и персистентные свойства условно-патогенных бактерий с учетом их роли в механизмах прогрессирования ХОБЛ.

7. Выявить взаимосвязи между сывороточным содержанием растворимых дифференцировочных молекул иммунных клеток и биологическими свойствами микрофлоры респираторного тракта при ХОБЛ.

8. Оценить влияние ингибитора фосфодиэстеразы-4 (рофлумиласт) на частоту обострений, симптомы, функцию легких и содержание растворимых дифференцировочных антигенов лейкоцитов и молекул гистосовместимости у больных тяжелой и крайне-тяжелой ХОБЛ.

9. Изучить влияние ингаляционных (небулизированный будесонид) и системных (преднизолон) кортикостероидов на клинические, функциональные показатели и сывороточные концентрации растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток при обострении ХОБЛ.

10. Определить возможности влияния неинвазивной вентиляции легких на клиничко-функциональные и иммунные характеристики больных с обострением ХОБЛ, осложненным острой дыхательной недостаточностью.

Научная новизна работы. Впервые изучено состояние пула растворимых дифференцировочных молекул и молекул гистосовместимости при фенотипах ХОБЛ в сочетании с бронхиальной астмой и ХОБЛ с частыми обострениями, оценена их прогностическая значимость.

Впервые показано значение растворимых дифференцировочных молекул иммунных клеток в качестве предикторов обострения ХОБЛ.

Впервые представлена характеристика комплекса патогенных и персистентных свойств условно-патогенных бактерий, колонизирующих нижние дыхательные пути, с оценкой их роли в прогрессировании ХОБЛ.

Впервые установлены корреляционные взаимосвязи между содержанием растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток в сыворотке больных ХОБЛ и биологическими свойствами микроорганизмов, выделенных у этих пациентов, раскрывающие механизмы взаимодействия в системе «микробиота-макроорганизм» при хронизации воспаления.

На основании исследования использованных биомаркеров состояния иммунитета определены дополнительные показания к назначению рофлумастила при тяжелой и крайне-тяжелой ХОБЛ.

Проведена комплексная клиничко-функциональная и иммунологическая оценка современных методов профилактики и лечения обострений ХОБЛ. На основании исследования растворимых дифференцировочных молекул лейкоцитов выявлены иммуномодулирующие эффекты рофлумастила, небулизированного

будесонида, комплексной терапии с использованием неинвазивной вентиляции легких.

Научная новизна подтверждена патентом РФ на изобретение «Способ прогноза прогрессирования хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ)» (патент 2599349, опубликовано 10.10.2016, бюл. № 28).

Теоретическая значимость работы. Изучение маркеров адгезии, дифференцировки, активации и апоптоза клеток позволило раскрыть тонкие механизмы нарушений иммунореактивности при различных клинических вариантах ХОБЛ, что вносит вклад в развитие персонализированного подхода к терапии. Полученные результаты о взаимоотношениях между микробиоценозом верхних и нижних отделов респираторного тракта при ХОБЛ поддерживают концепцию единства дыхательных путей и обосновывают роль аспирационного пути распространения бактериальной инфекции. Проведенный анализ персистентных характеристик условно-патогенных микроорганизмов содействует объяснению механизмов бактериальной колонизации респираторного тракта и хронизации воспаления при ХОБЛ. На основании полученных данных разработана концепция патогенеза ХОБЛ с позиций нарушения колонизационной резистентности нижних дыхательных путей и расстройства гомеостаза в системе «микробиота – макроорганизм».

Практическая значимость работы. Показана целесообразность исследования пула растворимых дифференцировочных молекул и молекул главного комплекса гистосовместимости в качестве предикторов обострения и маркеров активации воспалительного процесса, с целью прогнозирования особенностей и характера течения ХОБЛ, а также оценки иммуномодулирующих эффектов терапии.

Установлена целесообразность исследования персистентных характеристик микрофлоры нижних дыхательных путей при ХОБЛ с целью оценки колонизационного потенциала и прогнозирования тяжести ХОБЛ.

При проведении иммунологического мониторинга обосновано включение рофлумиласта в лечение больных тяжелой и крайне-тяжелой стабильной ХОБЛ, использование небулизированного будесонида и неинвазивной вентиляции легких в составе комплексной терапии обострений ХОБЛ.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач исследования использовались клинические, рентгенологические, инструментальные, эндоскопические, функциональные, лабораторные, иммунологические, микробиологические методы обследования больных ХОБЛ; при анализе данных использованы современные методы статистической обработки с использованием программ «Microsoft Excel 2013», «Statistica 10» и «Minitab 16».

Основные положения, выносимые на защиту

1. На ранних стадиях ХОБЛ при нормальном сывороточном профиле большинства растворимых дифференцировочных молекул с умеренным снижением содержания олигомерных фракций sCD38 и sCD54, молекул sCD50 и sHLA-I ведущая этиологическая роль в микробиоценозе нижних дыхательных путей принадлежит бактериям, вегетирующим на слизистых ротоглотки (зеленящие стрептококки, непатогенные нейссерии, стоматококки и др.) и коагулаза-негативным стафилококкам, отличающимся наиболее высоким уровнем антилактоферриновой активности.

2. Прогрессирование ХОБЛ, ассоциированное с увеличением кумулятивной интенсивности курения, сопровождается снижением содержания олигомерных и суммарных фракций растворимых рецепторов, модулирующих апоптоз, растворимых форм молекул адгезии, других дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости. Подобное истощение защитных систем макроорганизма совместно с усилением персистентного потенциала условно-патогенных бактерий (в виде расширения спектра антииммуноглобулиновой активности, нарастания антилизосимной и анти IgA активности) способствует нарушению колонизационной резистентности нижних дыхательных путей. Это сопровождается повышением микробной нагрузки за счет грамотрицательных

микроорганизмов (энтеробактерий и неферментирующих бактерий), увеличением числа полирезистентных штаммов, преобладанием микробных ассоциаций.

3. Нарушение гомеостаза респираторной микрэкосистемы ведет к хронизации дезадаптивной воспалительной реакции, что сопровождается увеличением частоты обострений, нарастанием бронхиальной обструкции, усилением выраженности респираторных симптомов (одышки, кашля, продукции мокроты). Активация хронического воспалительного процесса проявляется изменениями в состоянии пула растворимых лейкоцитарных дифференцировочных молекул и молекул гистосовместимости, что позволяет использовать эти биомаркеры для мониторинга выраженности воспаления и оценки эффективности терапии.

4. На основании изучения сывороточного содержания растворимых форм дифференцировочных антигенов клеток иммунной системы в сравнительных проспективных исследованиях были установлены иммуномодулирующие эффекты рофлумапта при тяжелой и крайне тяжелой стабильной ХОБЛ, небулизированного будесонида и неинвазивной вентиляции легких в составе комплексной терапии обострения ХОБЛ. Улучшение иммунологических параметров сопровождалось положительной динамикой клиническо-функциональных параметров, уменьшением частоты обострений, более быстрым их купированием и улучшением профиля безопасности при лечении обострений.

Степень достоверности и апробация работы. Основные положения диссертации представлены на: 3-м Конгрессе Европейского региона Международного Союза по борьбе с туберкулезом и легочными заболеваниями и 14-м Национальном Конгрессе Российского Респираторного Общества, Москва, 22-24 июня 2004 г.; 14-м Европейском респираторном Конгрессе, Глазго, Великобритания, 4 – 8 сентября 2004 г.; 21-м Европейском респираторном Конгрессе, Амстердам, Нидерланды, 24 – 28 сентября 2011 г.; I Съезде терапевтов Приволжского федерального округа и VIII Общероссийском медицинском форуме, Нижний Новгород, 24 – 25 октября 2013 г.; областной научно-практической

конференции по пульмонологии, Нижний Новгород, 2 марта 2013 г.; межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии. Эпидемические инфекции XXI века», Нижний Новгород, 12 декабря 2013 г.; III Съезде терапевтов Приволжского федерального округа, 16 – 17 апреля 2015 г.; межрегиональной научно-практической конференции «Современная стратегия и аспекты безопасности антибактериальной терапии в терапевтической практике», 3 октября 2015 г., Нижний Новгород; межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы пульмонологии в амбулаторной практике и в условиях стационара». Нижний Новгород, 12 марта 2016 г.; совместном расширенном заседании проблемной комиссии по внутренним болезням и кафедры пропедевтики внутренних болезней Нижегородской государственной медицинской академии, Нижний Новгород, 14 июня 2016 г.; XXVI Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания, Москва, 18 – 21 октября 2016 г.; заседании регионального отделения Российского научно-медицинского общества терапевтов, Нижний Новгород, 12 ноября 2016 г.

Публикации и отчеты результатов работы. По теме диссертации опубликовано 43 печатные работы, в том числе, 15 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в работу пульмонологических отделений Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Нижегородской области (ГБУЗ НО) «Городская клиническая больница № 10» г. Нижнего Новгорода, ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», в учебный процесс кафедры пропедевтики внутренних болезней федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия», используются в ходе занятий со студентами, клиническими ординаторами и интернами.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 256 страницах машинописного текста. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы. Список литературы содержит 151 отечественный и 244 иностранных источников. Работа иллюстрирована 42 таблицами и 23 рисунками.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ ПЕРСИСТЕНЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Хроническая обструктивная болезнь легких: обзор заболевания в свете современных представлений

Хроническая обструктивная болезнь легких, характеризующаяся хроническим воспалением дыхательных путей и прогрессирующим ограничением скорости воздушного потока, является широко распространенным заболеванием внутренних органов, которое можно предотвращать и лечить [248]. Во всем мире ХОБЛ является одной из основных причин заболеваемости и смертности. По оценкам Всемирной организации здравоохранения хронической обструктивной болезнью легких в мире страдают 328 млн. человек (168 млн. мужчин и 160 млн. женщин) [394]. Распространенность ХОБЛ в разных странах составляет от 4 – 6% до 10 – 25% взрослого населения [100]. Несмотря на программные мероприятия по борьбе с факторами риска, проводимые во многих странах, и появление новых возможностей терапии, заболеваемость ХОБЛ в мире остается высокой. Особенно бурный рост наблюдается в развивающихся странах, где в условиях эпидемии табакокурения (в основном, среди детей и молодежи) отмечается «омоложение» заболевания с наиболее высокой распространенностью (до 20%) в группе лиц 30 – 49 лет [282]. В России курят 25% женщин и 59% мужчин старше 15 лет, что в 1,3 – 1,6 раз превышает соответствующие показатели в европейском регионе ВОЗ [246].

По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации в 2013 г. было зарегистрировано около 2,4 млн. больных ХОБЛ [45]. По результатам исследования GARD (Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases), проведенного в 12 регионах Российской Федерации, спирометрически подтвержденный диагноз ХОБЛ был поставлен 21,8% пациентов с респираторными симптомами [203]. При экстраполяции этих данных на общую популяцию доля больных с диагнозом ХОБЛ составила бы 15,3% населения России (т.е., около 22 млн. человек), что почти в 10 раз превышает официальные

статистические данные. Распространенность ХОБЛ в России неоднородна. По данным российского эпидемиологического исследования, включившего 3771 лиц из разных климатогеографических регионов, распространенность ХОБЛ составила 12,9 – 15,7% среди лиц в возрасте 35 – 64 лет [147], увеличиваясь с возрастом до 20,6% среди лиц старше 70 лет [148]. Высокая распространенность ХОБЛ наблюдается как в крупных промышленных центрах [21, 92], так и в сельской местности [37, 148]. В Нижнем Новгороде, крупном городе с высокоразвитым индустриальным потенциалом, распространенность ХОБЛ по данным эпидемиологического исследования составила 8,24% среди 2124 респондентов (12,8% среди мужчин и 4,9 % среди женщин) [105]. Серьезной проблемой является существующее расхождение данных официальной статистики и результатов эпидемиологических исследований, что связано со скудной симптоматикой, низкой обращаемостью за медицинской помощью на ранних стадиях и гиподиагностикой ХОБЛ. В целом, ХОБЛ до сих пор остается недооцененным заболеванием, на что указывает и тот факт, что количество исследований, посвященных распространенности бронхиальной астмы, рака, сердечно-сосудистой и другой важной патологии, значительно превышает число таких исследований при ХОБЛ [301].

Вместе с тем, при оценке глобального ущерба, смертность от ХОБЛ в мире демонстрирует тенденцию к росту, поднявшись с 6-го места в 1990 году на 4-е место в 2000 году [282], затем на 3-е место в 2012 году [295] и продолжает делить 3 – 4-е место с инфекциями нижних дыхательных путей в настоящее время. По прогнозам, до 2030 года ХОБЛ останется в «четверке лидеров» [288], обуславливая 27% смертей, связанных с курением. Ежегодно в мире умирает от ХОБЛ около 3 млн. человек [193], что составляет около 6% всех случаев смерти [295]. В России ХОБЛ входит в «десятку» лидирующих причин смерти: в 2015 году от хронических обструктивных заболеваний легких умерло более 33 тыс. человек [113], что составило около 2% среди всех случаев смерти. Преждевременная смертность от болезней органов дыхания в Российской Федерации (41,9 на 100 тыс.) в 2 раза

превышает этот показатель в европейском регионе ВОЗ и более чем в 3 раза – в странах Евросоюза [147, 295]. В связи с постарением населения и увеличением ожидаемой продолжительности жизни, а также повсеместным распространением основных факторов риска, к которым относятся активное и пассивное курение табака и загрязнение воздуха в помещениях и на улице, прогнозируется дальнейший рост заболеваемости и смертности от данной патологии [248].

ХОБЛ значительно снижает качество жизни пациентов и является одной из основных причин инвалидности. По показателю, оценивающему суммарное «бремя болезни» (DALY, Disability-adjusted life year – годы жизни, скорректированные по нетрудоспособности), ХОБЛ переместится с 11 места (в 2002 году) на 7-е к 2030 году [282].

На развитие и прогрессирование ХОБЛ оказывают влияние генетически детерминированные факторы риска, такие как наследственная недостаточность α 1-антитрипсина [359], гены матриксной металлопротеазы [292], α -никотин-ацетилхолинового рецептора и другие [273]. Среди экзогенных факторов риска наиболее значимым и изученным, хотя и не единственным, является курение. Как было показано в обзоре S.S. Salvi, P.J. Barnes (2009), согласно данным популяционных исследований в 25-45% случаев ХОБЛ не ассоциирован с курением [201]. В настоящее время появляется все больше данных о влиянии других факторов окружающей среды на развитие ХОБЛ: профессиональные вредности [303], экологические факторы (загрязнение воздуха при сжигании биотоплива, задымленность, пыль) [282], сельскохозяйственные работы и использование сельскохозяйственных пестицидов [268, 303]. Дискутируется роль туберкулеза и частых инфекций в детском возрасте [301]. Ряд других теорий относят происхождение ХОБЛ к фетальному периоду. Ретроспективные исследования показали, что ХОБЛ может быть «запрограммирована» на ранних этапах жизни. Для развития ХОБЛ во взрослом возрасте имеет значение низкий вес при рождении, респираторные инфекции в детском возрасте, дефицит витамина D, курение родителей и другие факторы [301, 388]. Также ограниченный контакт с

микроорганизмами вследствие приема матерью антибиотиков до и после родов, рост числа кесаревых сечений, создание стерильного окружения для ребенка ведет к нарушению формирования эффективного противoinфекционного иммунитета и сдвигу субпопуляционных отношений Т-хелперов (Th) I и II порядка (Th1/Th2) в соответствии с «гигиенической гипотезой» [301]. Определенное значение в патогенезе воспаления при ХОБЛ может иметь также аутоиммунный компонент [181], который может объяснить сохранение нерегулируемого воспаления даже после прекращения курения вследствие того, что первоначальное повреждение легких создает эпитопы для аутоиммунной атаки.

Последние обновления стратегии и тактики ведения больных ХОБЛ (GOLD 2011 - 2016) касаются переходов к комбинированной оценке ХОБЛ, основанной не только на учете тяжести спирометрических нарушений, но и выраженности симптомов, наличия сопутствующих заболеваний и определении риска будущих обострений [248]. Обострения и сопутствующие заболевания вносят существенный вклад в общую тяжесть ХОБЛ у отдельных пациентов. Сопутствующая патология, такая, как сердечно-сосудистые заболевания, тревожно-депрессивный синдром, рак легких, инфекционные заболевания и сахарный диабет часто встречаются у пациентов с ХОБЛ и оказывают влияние на качество жизни и прогноз [243]. Обострения являются основными факторами ухудшения здоровья пациентов, ведут к снижению легочной функции и ассоциированы со значительной летальностью, особенно при необходимости частых госпитализаций [253]. Обострения ХОБЛ определяются как острые эпизоды ухудшения симптомов, выходящие за рамки повседневных колебаний и требующие изменений терапии. Во время обострений дополнительно активированы основные механизмы, характерные для ХОБЛ, в том числе воспалительный процесс [331] и обструкция дыхательных путей с последующей гиперинфляцией [302]. Как было показано в обзоре М. Miravittles, А. Anzueto (2015), инфекционные патогены, т.е. вирусы и бактерии, несут ответственность за обострение процесса более чем в половине всех случаев [291]. В последние годы выделен особый фенотип “с частыми обострениями” [362], что

отражает неоднородность и разнообразие факторов и механизмов, вовлеченных в патогенез ХОБЛ [4]. Повышенная склонность к обострениям ассоциирована с персистирующим воспалительным процессом в легочной ткани, изменением микробиоценоза нижних дыхательных путей, состоянием иммунной системы, сопутствующими заболеваниями (гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь и т.д.) и другими факторами.

Еще одним шагом в развитии представлений о гетерогенности ХОБЛ явилось выделение нового фенотипа – перекрест-синдрома бронхиальная астма-ХОБЛ (БА-ХОБЛ), критерии диагностики которого сформулированы в рекомендациях совместного проекта «Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких» (GOLD) и «Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы» (GINA) в 2015 году [225]. Перекрест-синдром характеризуется персистирующим ограничением воздушного потока и наличием признаков обоих заболеваний – как астмы, так и ХОБЛ. У пациентов с первоначальным диагнозом бронхиальной астмы распространенность перекрест-синдрома составляет 29% [180]. При первичном ХОБЛ распространенность этого сочетания колеблется от 13% до 55% в зависимости от используемых диагностических критериев (астма в анамнезе до 40 лет, наличие любых симптомов астмы и т.д.) [313, 378]. По данным эпидемиологических исследований врачи ставят диагноз перекрест-синдрома БА-ХОБЛ у 15-20% пациентов с бронхообструктивными заболеваниями [225]. В настоящее время перекрест БА-ХОБЛ представляет трудную диагностическую задачу для врача в связи с отсутствием конкретных биомаркеров, позволяющих дифференцировать этот синдром от астмы или ХОБЛ [128, 378]; к тому же молекулярный эндотип БА-ХОБЛ (например, повышенный уровень маркеров эозинофильных воспаления) не всегда соответствует клиническому фенотипу [244]. В связи с этим поиск потенциальных маркеров, характеризующих воспаление при БА-ХОБЛ, имеет большое практическое значение. Недавние исследования показали, что особенностью иммунного ответа больных с синдромом

астма-ХОБЛ является сочетание характеристик, специфичных для того и другого заболевания [244, 350]. Пациенты с клиническим диагнозом БА-ХОБЛ отличаются более частыми обострениями и госпитализациями с более высоким риском неблагоприятных исходов по сравнению с ХОБЛ без сопутствующей астмы; как правило, у больных с перекрест-синдромом сильнее выражена одышка и свистящие хрипы в легких, хотя по интенсивности кашля и продукции мокроты они не отличаются от ХОБЛ [186].

Выделение различных фенотипов заболевания является необходимым условием для обеспечения индивидуализации терапии, которая даст возможность повысить эффективность лечебного воздействия и минимизировать побочные эффекты. Наиболее остро проблема персонифицированной терапии стоит при ХОБЛ, ассоциированной с частыми обострениями и быстрым прогрессированием, которая характеризуется ранней инвалидизацией больных и высоким риском смерти. Основные цели терапии стабильной ХОБЛ, определенные в последних редакциях GOLD и состоящие не только в уменьшении симптомов, но и снижении будущего риска, также отражают движение в сторону индивидуализированной медицины [51, 218]. Подбор терапии с использованием существующих бронходилататоров (β_2 -агонистов, М-холинолитиков) и противовоспалительных лекарственных средств осуществляется на основе комбинированной оценки ХОБЛ с распределением пациентов на группы А, В, С, D [23, 248].

Возможные опции противовоспалительной терапии больных ХОБЛ с риском частых обострений изложены в международных и отечественных рекомендациях [131, 248]. Среди препаратов, контролирующих воспаление, важное место занимает плановая терапия ингаляционными глюкокортикоидами (иГК), которые в комбинации с длительно действующими β_2 -агонистами (ДДБА) улучшают легочную функцию и снижают частоту обострений у пациентов с тяжелой и очень тяжелой ХОБЛ, а в сочетании с тиотропия бромидом положительные эффекты усиливаются [381]. Хороший ответ на кортикостероиды характерен для пациентов с фенотипом «ХОБЛ+БА», характерной чертой которого является выраженное

эозинофильное воспаление, представляющее точку приложения действия иГК [274]. В рекомендациях Испанского общества пульмонологов и торакальных хирургов таким больным показано раннее назначение комбинированных лекарственных средств, включающих иГК, уже при I - II степени тяжести [215, 358]. Согласно заключению Совета экспертов Российского респираторного общества, для уточнения показаний к назначению иГК необходимо проводить фенотипирование пациентов. Длительная терапия иГК показана больным с сочетанием БА и ХОБЛ; с высоким риском обострений (объем форсированного выдоха за 1-ю секунду ($ОФВ_1$) $<50\%$ должного при более 2 неинфекционных обострениях в год или более 1 госпитализации по поводу неинфекционного обострения); с эозинофилией мокроты $>3\%$ и/или >300 клеток в 1 мл крови [99]. Невелика роль иГК при эмфизематозном варианте с редкими обострениями вследствие необратимости изменений и мало выраженного воспалительного компонента [24]. Также необходимо учитывать, что у больных ХОБЛ, с одной стороны, нередко наблюдается стероидорезистентность, а с другой, назначение иГК на регулярной основе сопряжено с риском побочных эффектов, в том числе с развитием пневмоний. Кроме того, иГК практически не действуют на нейтрофилы и макрофаги, которые составляют основу воспаления при ХОБЛ [87].

Не так давно появился новый класс препаратов с ХОБЛ-специфической противовоспалительной активностью – селективные ингибиторы фосфодиэстеразы-4 (ФДЭ-4), единственным представителем которого в настоящее время является рофлумиласт. Фермент ФДЭ-4 является регулятором метаболизма циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) как в структурных, так и в иммунных клетках, вовлеченных в патогенез воспаления при ХОБЛ. Подавление ФДЭ-4 способствует внутриклеточному накоплению циклического нуклеотида, что ведет к активации протеинкиназ, обеспечивающих фосфорилирование регуляторных белков. Повышение уровня протеинкиназы А приводит к ингибированию провоспалительной активности клеток и медиаторов, расслаблению гладкой мускулатуры бронхов, замедлению ремоделирования эпителия и блокаде фиброза

[316]. В ходе рандомизированных плацебо-контролируемых исследований была доказана эффективность рофлумиласта в профилактике обострений ХОБЛ [233].

Стратегический подход к лечению обострений в свете современных представлений включает как меры по снижению воздействий и последствий текущего обострения, так и предупреждение развития последующих эпизодов [248]. Фармакотерапия обострений включает бронхолитики, антибиотики, системные кортикостероиды. Противовоспалительная терапия системными глюкокортикоидами (ГК) не только сокращает сроки наступления ремиссии, улучшает функцию внешнего дыхания (ФВД) и корригирует гипоксемию, но и позволяет снизить риск ранних рецидивов и неудач терапии [220]. Современные редакции GOLD и отечественные клинические рекомендации в качестве альтернативного варианта системным ГК рассматривают ингаляционную небулайзерную терапию будесонидом [212]. При тяжелом жизнеугрожающем обострении стационарное лечение обострений включает также респираторную поддержку – кислородотерапию и вентиляционное пособие, в том числе и неинвазивную вентиляцию легких (НВЛ). Применение НВЛ при острой дыхательной недостаточности позволяет достигнуть положительного результата в 80-85% случаев и, что самое главное, снижает риск летального исхода и необходимость искусственной вентиляции легких [310].

Эффективность и безопасность разных методов лечения изучались в рандомизированных контролируемых клинических исследованиях. Актуальной проблемой в настоящее время является оценка влияния различных терапевтических опций на молекулярные маркеры воспаления при ХОБЛ.

1.2. Воспаление как основа патогенеза хронической обструктивной болезни легких

В основе патогенеза ХОБЛ лежит воспаление, развивающееся вследствие ответа на экспозицию аэрополлютантов, и приводящее к бронхиальной обструкции. Результатом длительного действия ирритантов сигаретного дыма, являющегося основным этиологическим фактором, или других агрессивных частиц

и газов окружающей среды является индукция патологических процессов в дыхательных путях, включая нарушение мукоцилярного клиренса, ремоделирование дыхательных путей и формирование необратимой бронхиальной обструкции, нарушение легочной вентиляции и газообмена, развитие легочной гипертензии и легочного сердца, а также системные проявления. Воздействие оксидантов табачного дыма с последующей активацией макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов и эпителиальных клеток приводит к оксидативному стрессу, усиливающему повреждение эпителиальных клеток и способствующему прогрессированию воспаления [32, 101]. Свободные радикалы кислорода оказывают как прямое повреждающее воздействие на клетки-мишени, так и опосредованное, путем активации факторов транскрипции: NF-κB, AP-1, MAP-киназы, которые индуцируют синтез провоспалительных цитокинов, экспрессию интерлейкина-8, СХС-хемокинов, усиливая приток макрофагов и нейтрофилов в очаг воспаления [118, 139]. Также свободные радикалы способствуют активации апоптоза пневмоцитов при ХОБЛ [184], что впоследствии оказывает влияние на процессы перестройки легочной ткани. Существуют многочисленные данные, свидетельствующие о текущем воспалительном процессе в легочной ткани у курильщиков. Исследования биопсийного материала и мокроты [259, 262], экспериментальные лабораторные данные [348] выявляют воспалительную клеточную инфильтрацию и большое количество провоспалительных молекул в легких курильщика. При определенном уровне экспозиции табака или действии других факторов риска деструктивный процесс начинает преобладать над локальными защитными механизмами, что ведет к повреждению легочной ткани. При ХОБЛ воспалительное повреждение тканей, индуцированное курением, продолжается даже после прекращения курения [349]. Механизмы этого пока неизвестны, но рассматривается роль аутоиммунитета и персистирующей инфекции [217]. Ассоциированные с воспалением факторы, способствующие повреждению легочной ткани, включают клетки и медиаторы воспаления, свободные радикалы, дисбаланс протеаз/антипротеаз и другие механизмы.

1.2.1. Клетки, реализующие воспаление при хронической обструктивной болезни легких

Нейтрофилы

Роль нейтрофилов, как циркулирующих, так и аккумулярованных в легких, в развитии индуцированного курением повреждения тканей, давно известна. Исследования последних лет также обнаруживают в мокроте пациентов ХОБЛ повышение числа нейтрофилов наряду с увеличением растворимых рецепторов провоспалительного цитокина интерлейкина-6 [262]. Аналогичные воспалительные сдвиги были обнаружены ранее и в бронхоальвеолярной жидкости [369]. Нейтрофилам принадлежит ключевая роль в деструкции эластического матрикса альвеол; они действуют через протеазы и катионные пептиды (дефензины), атакуя бактерии, вирусы, поллютанты, а при определенных условиях, и собственные ткани [174], что ведет к аутоиммунному воспалению. Под влиянием экзогенных стимулов (сигаретный дым и т.д.) лизосомальные ферменты и пептиды, высвобождающиеся из нейтрофилов, расщепляют коллаген на фрагменты, которые могут активировать клетки воспаления и приводить в дальнейшем к развитию хронического воспалительного процесса [206]. Кроме того, исследователи показали, что нейтрофилы пациентов ХОБЛ содержат в 25 раз больше внутриклеточных протеолитических ферментов, чем клетки здоровых доноров. Иммуногистохимические анализы установили, что протеолитические ферменты содержатся в нейтрофилах, макрофагах и эпителиальных клетках.

Сигналы, обеспечивающие рекрутирование нейтрофилов в очаг воспаления, отчасти уже идентифицированы. Было показано, что миграцию нейтрофилов индуцируют различные хемоаттрактанты: провоспалительные цитокины (интерлейкин-8 и др.), СХС-хемокины, лейкотриен В₄ [275], олигомерный формилпептид [304]. Активация последнего ассоциирована со взаимодействием хозяин – микроорганизм, остальные генерируются собственными иммунными клетками или поврежденными тканями организма хозяина. Также в качестве кандидатов на роль хемоаттрактантов нейтрофилов выступают модифицированные

формы $\alpha 1$ -антитрипсина [157], которые становятся особенно актуальными на этапе воспалительной деструкции легких, когда преобладают процессы протеолиза и свободно-радикальных атак, а $\alpha 1$ -антитрипсин является основной антипротеазой в легких.

Основная роль в адгезии нейтрофилов к эпителиальным клеткам отводится экспрессированным на их мембране молекулам межклеточной адгезии. Показано, что адгезивная активность эпителиальных клеток повышается после их инкубации в атмосфере сигаретного дыма или после инфицирования респираторными вирусами. Модуляция взаимодействия нейтрофила с эпителиальной клеткой может иметь практическое значение. При острой респираторной инфекции усиленная адгезия нейтрофилов облегчает их микробицидную активность. Наоборот, при хроническом бронхите повышенная адгезия нейтрофилов к активированным эпителиальным клеткам может индуцировать бесконтрольное развитие цитотоксичности, опосредованной нейтрофилами, что приводит к повреждению эпителиального слоя [241]. В связи с этим изучение роли молекул адгезии при хроническом воспалении и его обострении у больных ХОБЛ представляет большой интерес, как для понимания базовых патофизиологических процессов, так и углубления клинических знаний об этом заболевании.

Представления об основной роли нейтрофилов и нейтрофильных протеиназ в деструкции легочной ткани при ХОБЛ в последнее время уступают место наблюдениям, свидетельствующим, что решающими медиаторами при ХОБЛ являются высвобождаемые макрофагами металлопротеиназы (ММП). Однако, нейтрофилы по-прежнему рассматриваются в качестве иницирующих клеток, продуцентов хемоаттрактантов и эпитопов, важных для дальнейшего персистирования воспаления. На животных моделях было показано, что нейтрофилы появляются в дыхательных путях сразу же после индуцированного табачным дымом повреждения тканей и далее накапливаются в легких [155]; более того, количество нейтрофилов в подслизистом слое коррелирует с интенсивностью курения [200]. Однако, нейтрофильная инфильтрация в

дыхательных путях может быть и у курильщиков без ХОБЛ [257]. Таким образом, сценарий участия нейтрофилов в повреждении легочной ткани находится в процессе дальнейшего изучения, т.к. появляются новые данные, например, об отличительных особенностях нейтрофилов у курильщиков с ХОБЛ и курильщиков без ХОБЛ, в том числе при наличии инфекции [333].

Макрофаги

При подсчете воспалительных клеток, инфильтрирующих легочную паренхиму у курильщиков (Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов), *in situ* (на кубический миллиметр ткани легкого) было установлено, что число нейтрофилов обратно пропорционально степени эмфиземы, а количество Т-лимфоцитов и макрофагов тесно связано со степенью деструкции легких [166], причем содержание Т-клеток и макрофагов коррелирует между собой, свидетельствуя о совместном действии этих клеток. Макрофаги играют важную роль при ХОБЛ, они считаются основными производителями матриксных металлопротеаз [249]. Они также участвуют в распространении воспаления, высвобождая молекулы хемоаттрактантов. Было показано, что циркулирующие предшественники макрофагов легких, т.е., моноциты периферической крови, также различаются по своим характеристикам у пациентов с ХОБЛ и здоровых добровольцев [208]. Провоспалительные свойства циркулирующих моноцитов могут объяснить системность поражения, характерную для ХОБЛ. Альвеолярные макрофаги локализуются в эмфизематозных участках легких; повышенное содержание их было обнаружено в дыхательных путях пациентов и легочной паренхиме, в мокроте и бронхоальвеолярной жидкости; причем количество макрофагов в дыхательных путях коррелирует с тяжестью ХОБЛ [347]. Как было убедительно продемонстрировано в обзоре Р. Barnes (2014), при ХОБЛ рекрутированные в легкие макрофаги усиливают высвобождение фактора некроза опухоли α (Tumor Necrosis Factor, TNF- α), интерлейкина-8, интерлейкина-6, интерлейкина-1 β , СХС-хемокинов, моноцитарного хемотаксического пептида-1, лейкотриена В4 и др. медиаторов [184], а также секретируют эластазы, включая

ММП-2, ММП-9, ММП-12, катепсины K, L и S [168]. В результате альвеолярные макрофаги играют центральную роль в привлечении нейтрофилов в альвеолы и в дистальные отделы дыхательных путей, а также являются ключевыми продуцентами протеаз. Активность макрофагов, в основном, регулируется с помощью ядерного фактора NF-κB, экспрессия которого повышена в альвеолярных макрофагах пациентов с ХОБЛ [259], особенно в период обострений. Тканевые макрофаги сегодня рассматриваются как многофункциональные клетки, которые способствуют регенерации тканей, компенсаторному легочному росту и рекрутированию клеток-предшественников [167, 264]. Таким образом, они одинаково важны как в борьбе с инфекцией и сокращении воспалительных сигналов, так и удалении апоптотических клеток и индукции восстановительных процессов.

Т-лимфоциты

Т-клетки составляют около 70% лимфоцитов периферической крови. Вместе с тем становится очевидным, что большое их количество локализуется также на эпителиальных поверхностях, в том числе в бронхах и легких, и опосредует ключевые узлы защиты. Недавнее исследование R. Purwar et al. (2011) показало, что содержание Т-клеток в легких человека превышает 10 млрд. [328]. Т-лимфоциты играют важную роль в регуляции специфического иммунного ответа и стимуляции ряда неспецифических механизмов воспаления.

Т-хелперы (CD4⁺ клетки), участвующие в регуляции иммунного ответа, в зависимости от цитокинового профиля могут быть подразделены на Т-хелперы I и II порядка. Основными цитокинами Th1-лимфоцитов являются γ-интерферон и интерлейкин-2 (IL-2). Эти цитокины стимулируют эффекторные функции иммунной системы, способствуют развитию клеточного иммунного ответа, активируя цитотоксические Т-лимфоциты; однако чрезмерный воспалительный ответ может привести к неконтролируемому повреждению тканей, в том числе и вследствие аутоиммунного повреждения. В настоящее время накоплены данные, позволяющие рассматривать эмфизему легких как заболевание, опосредованное Т-

хелперами I порядка [216]. Эти представления поддерживаются обнаружением повышенного уровня молекул, ассоциированных с Th1-лимфоцитами, в периферической крови пациентов с ХОБЛ. Основными цитокинами Th2-клеток являются IL-4, IL-5, IL-13, которые активируют гуморальный иммунный ответ и оказывает существенное влияние на накопление эозинофилов, продукцию IgG4 и IgE, экспрессию низкоаффинного рецептора для IgE на тучных клетках и В-лимфоцитах. Th2-клетки и их цитокины играют важную роль в патогенезе бронхиальной астмы [392].

Хроническое воздействие сигаретного дыма и аэрополлютантов способствует рекрутированию в легочную ткань также Т-хелперов 17 (Th17), часто ассоциированных с аутоиммунными процессами. При этом продукция Th1 и Th17 лимфоцитами основных цитокинов – интерферона- γ и интерлейкина-17, коррелирует с тяжестью заболевания [181]. Представление о ХОБЛ как о воспалении с аутоиммунным компонентом открывает новые перспективы не только для изучения патогенеза этого заболевания, но и для поиска новых подходов к лечению.

Цитотоксические CD8⁺ лимфоциты – это подгруппа клеток, которые убивают инфицированные или поврежденные клетки. Было показано, что они также участвуют в генезе эмфиземы легких. Если у курильщиков с нормальной функцией внешнего дыхания в легочной паренхиме преобладают нейтрофилы, то при наличии эмфиземы наблюдается увеличение Т-клеток (CD3⁺ и CD8⁺) [284]. При эмфиземе легких количество CD8⁺ клеток коррелирует с выраженностью тканевого повреждения, и их накопление продолжается даже после прекращения курения [227]. Однако, по данным других авторов эта корреляция носит нелинейный характер: при прогрессировании заболевания число цитотоксических Т-клеток может даже снижаться [347]. Впрочем, тонкая взаимосвязь между регуляторными CD4⁺ клетками и цитотоксическими CD8⁺ клетками может быть нарушена при воспалительных, аутоиммунных и других патологических процессах, характеризующих поздние стадии ХОБЛ [217].

Роль Т-клеток и их субпопуляций при ХОБЛ продолжает интенсивно изучаться. Весь комплекс накопленных данных говорит о том, что дифференцированные взаимосвязи между Т-клеточными субпопуляциями у курильщиков с ХОБЛ могут иметь значение для персистенции и прогрессирования воспаления [184, 260]. Важность Т-лимфоцитов в развитии ХОБЛ/эмфиземы легких была также недавно показана на мышинной модели, продемонстрировавшей способность Т-клеток, полученных от мышей, подвергшихся экспозиции сигаретного дыма, переносить патологический процесс, т.е., разрушение тканей, на мышей, не обработанных табачным дымом; для этого необходимы обе субпопуляции Т-лимфоцитов (как CD8⁺, так и CD4⁺ клетки) и участие молекул гистосовместимости I класса [240]. Полученные результаты демонстрируют значение индуцированного курением Т-клеточного механизма в развитии ХОБЛ.

Натуральные киллеры (NK) в легких имеют преимущественно “цитотоксический” CD56⁺CD16⁺ фенотип; у них часто встречается ко-экспрессия антигена CD8, но процент экспрессирующих CD8 клеток падает при снижении ОФВ₁ [254]. Натуральные киллеры легких проявляют естественную цитотоксичность в отношении аутологичных структурных клеток легочной ткани без дополнительной стимуляции. При тяжелой ХОБЛ эта спонтанная цитотоксичность возрастает, свидетельствуя о потенциальной роли натуральных киллеров в прогрессировании ХОБЛ и эмфиземы легких.

Эозинофилы

Роль эозинофилов при ХОБЛ в настоящее время активно изучается. Эозинофилы секретируют ряд провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста, включая интерлейкины IL-4, IL-5, IL-13, фактор некроза опухоли, трансформирующий фактор роста α/β и т.д., что отражает их иммунорегуляторные функции [221]. Эозинофилы привлекаются в дыхательные пути другими клеточными элементами и могут рассматриваться как важные эффекторные клетки, работающие на заключительных этапах иммунной реакции.

В последние годы появились данные, что несмотря на типичное для ХОБЛ нейтрофильное воспаление, у 10-40% пациентов в мокроте встречается эозинофилия [245]. Как показало 3-х летнее наблюдение за больными в рамках исследования ECLIPSE (Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End points), выявленная эозинофилия крови носила персистирующий характер [237]. В период обострений в цитогамме бронхиального и бронхоальвеолярного смывов больных ХОБЛ могут встречаться не только нейтрофилы, но и эозинофилы. В исследованиях по фенотипированию обострений ХОБЛ и выявлению биомаркеров эозинофилия мокроты выявлялась при 28% обострений [156]. Особого внимания в этой связи заслуживает фенотип ХОБЛ в сочетании с БА, для которого характерна более полная обратимость бронхиальной обструкции, более выраженная эозинофилия мокроты и хороший клинический эффект ингаляционных кортикостероидов [141] по сравнению с большинством больных ХОБЛ. Недавно было показано, что у больных ХОБЛ и БА-ХОБЛ эозинофилия мокроты и крови является предиктором хорошего ответа на ингаляционную кортикостероидную терапию [25, 178, 189, 274]. Рассматривается возможность использования при ХОБЛ и других препаратов, модулирующих эозинофильное воспаление: антагонистов лейкотриеновых рецепторов, теофиллинов, моноклональных антител против IgE. В стадии клинических испытаний находятся методы таргетной терапии, способствующие подавлению эозинофильного/Th2 опосредованного воспаления, такие как моноклональные антитела против интерлейкинов IL-5, IL-4, IL-13 и их рецепторов, против хемокиновых рецепторов, против фактора роста гранулоцитов/макрофагов [245].

Медиаторы воспаления

Известно, что с ХОБЛ ассоциированы десятки цитокинов и хемокинов, которые выделяются не только клетками организма хозяина, но и микроорганизмами. Бактериальные липополисахариды и другие медиаторы способствуют развитию локального воспаления. Под действием оксидативного стресса, индуцированного вредными внешними воздействиями, легочный

эпителий высвобождает TNF- α , IL-1 β , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, IL-8 и другие медиаторы. Макрофаги выбрасывают хемокины, а также вырабатывают протеолитические ферменты, матриксные металлопротеазы, катепсины и т.д. [184, 301]. Основным дирижером межклеточных взаимодействий и регулятором медиаторов воспаления при ХОБЛ является фактор транскрипции NF- κ B [194].

Однако, детали функционирования цитокинов в воспалительном ответе до конца неизвестны, что затрудняет разработку таргетной антицитокиновой терапии. Так, использование моноклональных антител против TNF- α , основного провоспалительного цитокина, не дало ожидаемого клинического результата, но напротив, увеличило риск инфекционных осложнений и опухолей [231]. Очевидно, что цитокины при ХОБЛ играют важную роль и оказывают плеiotропное действие, но их функциональная блокада может привести к углублению дисрегуляции иммунных процессов, которая имеет место при ХОБЛ. Проблемы возникают и при использовании кортикостероидов, которое может сопровождаться серьезными нежелательными явлениями, включая метаболические нарушения, иммунный дисбаланс, ведущий к снижению резистентности к инфекциям и т.д. Противовоспалительный и иммунодепрессивный эффект кортикостероидов бывает сложно разграничить, т.к. в обоих случаях механизм действия связан с влиянием на одни и те же клетки. Другая проблема применения ГК при ХОБЛ заключается в резистентности к стероидным гормонам, обусловленной инактивацией деацетилазы гистонов в условиях вызванного курением оксидативного стресса [185].

В связи с этим большое внимание в настоящее время уделяется поиску других путей контроля воспаления при ХОБЛ. Новые возможности открываются с использованием рофлумиласта – селективного ингибитора ФДЭ-4, который обладает широким спектром противовоспалительных опций, включая угнетение апоптоза, ингибирование воспалительных медиаторов и экспрессии поверхностных маркеров клеток. Рандомизированные клинические исследования

показали достоверное улучшение легочных объемов при форсированной спирометрии, а также уменьшение частоты среднетяжелых и тяжелых обострений ХОБЛ, в особенности у больных с бронхитическим вариантом и тяжелым течением ХОБЛ [391]. В настоящее время рофлумиласт рекомендуется как дополнение к длительнодействующим бронходилататорам для лечения тяжелой – очень тяжелой ХОБЛ, ассоциированной с хроническим бронхитом и частыми обострениями [248]. Рофлумиласт и кортикостероиды нацелены на разные сигнальные пути, и сочетание их обуславливает добавочные противовоспалительные эффекты [158], в том числе и в отношении CD8⁺ клеток, выделенных от больных ХОБЛ, как было показано совсем недавно [159]. Эти экспериментальные данные нашли отражение и в опубликованных в 2015 году результатах многоцентрового клинического исследования REACT (Roflumilast and Exacerbations in patients receiving Appropriate Combination Therapy), где рофлумиласт добавлялся к комбинации ингаляционных кортикостероидов и ДДБА [233].

Таким образом, ХОБЛ характеризуется прогрессирующей обструкцией мелких дыхательных путей с развитием эмфиземы и ассоциирован с клеточным воспалением и структурным ремоделированием легочной ткани. Другие патогенетические механизмы включают в себя апоптоз и пролиферацию клеток, а также деструкцию и репарацию тканей. Выброс металлопротеаз вместе с действием апоптотических факторов может лежать в основе развития эмфиземы, а фиброз мелких бронхов, видимо, связан с активацией факторов роста [204]. На поздних стадиях заболевания патогенетические факторы включают аутоиммунный компонент, абнормальную активацию или истощение дендритных клеток и Т-клеточных иммунных реакций, процессы апоптоза. Нарушения программируемой клеточной гибели, как и неспособность макрофагов поглощать апоптотические клетки и бактерии может усиливать воспалительные реакции. Системное воспаление, лежащее в основе развития сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний и метаболического синдрома, связано с окислительным стрессом и влиянием сигаретного дыма на разные ткани и органы [127]. Резистентность к

кортикостероидам при ХОБЛ обусловлена механизмом, вторичным по отношению к окислительному стрессу, таким как инактивация гистон-деацетилазы. Механизмы ХОБЛ могут быть неоднородными в зависимости от степени тяжести и клинического фенотипа и должны быть соотнесены с клеточно-молекулярными патологическими процессами. Лечение пациентов ХОБЛ должно быть индивидуализированным и направленным на конкретные механизмы.

1.2.2. Растворимые формы мембранных антигенов лейкоцитов и их роль в генезе воспаления при хронической обструктивной болезни легких

Преимущественная локализация, характер и активность воспалительного процесса определяют особенности течения и фенотип ХОБЛ, скорость прогрессирования заболевания, являются маркером эффективности терапии и важным прогностическим фактором [204]. Воспалительная реакция при ХОБЛ является результатом сложной кооперации клеток (нейтрофилов, альвеолярных макрофагов, CD8⁺ лимфоцитов и др.), которые несут на своей поверхности разнообразные мембранные антигены, характеризующие направление их дифференцировки, степень зрелости и функциональную активность [83].

Путем протеолитического шеддинга или альтернативного сплайсинга матричной РНК мембранные антигены могут образовывать растворимые формы (s-формы), которые обнаруживаются в сыворотке крови, синовиальной жидкости и других биологических жидкостях. Растворимые дифференцировочные молекулы, с одной стороны, отражают уровень мембранной экспрессии антигена, а с другой – способны к модуляции иммунного ответа [107, 108]. При патологии содержание растворимых дифференцировочных антигенов в крови или других биологических жидкостях, как правило, изменяется, что имеет практическое значение и дает важную информацию для диагностики, прогнозирования, а также контроля за эффективностью терапии.

Выделяют три основные группы лейкоцитарных антигенов, имеющих растворимые формы: 1) молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II классов (HLA-I, HLA-DR); 2) рецепторы цитокинов (CD25 – рецептор α -цепи IL-

2); 3) антигены, участвующие в созревании и активации клеток иммунной системы и выполнении ими эффекторных функций: CD50 и CD54 – молекулы адгезии, CD25 и CD38 – активационные антигены лимфоцитов, CD95 (Fas/Apo-1) – рецептор апоптоза, CD4 – дифференцировочный антиген Т-хелперов, CD8 – дифференцировочный антиген цитотоксических Т-лимфоцитов, CD14 – маркер зрелых моноцитов/макрофагов, CD16 – дифференцировочный антиген натуральных киллеров (NK-клеток) и т.д. [83].

Растворимые формы молекул главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС)

Молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II класса обеспечивают распознавание чужеродных и аутоантигенов в ходе иммунного ответа. Распознавание антигена происходит при представлении его Т-лимфоциту только в контексте собственного аллельного варианта молекулы МНС на поверхности антиген-презентирующей клетки: CD4⁺ клетки распознают антиген в комплексе с молекулами гистосовместимости II класса, а CD8⁺ клетки – в сочетании с молекулами МНС класса I [134]. Растворимые формы молекул HLA I и II классов, связываясь со своими лигандами CD8 и CD4, способны модулировать Т-клеточную активность и вызывать апоптоз *in vitro*. Так, экспериментальным путем было показано, что в результате взаимодействия молекул sHLA-I с мембранными антигенами CD8 на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов нарушается процесс распознавания презентированных антигенных пептидов и стимулируется продукция растворимого Fas-лиганда. Секретируемые растворимые формы Fas-лиганда оказывают аутокринный эффект, т.к. способны взаимодействовать с мембранным Fas (CD95) рецептором на этих же клетках, инициируя апоптоз цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов [354] и CD8⁺ NK-клеток [356]. С другой стороны, недавно было показано, что растворимые мономеры HLA-I способны вызывать антиген-зависимую активацию CD8⁺ клеток *in vitro* вследствие пассивного обмена пептидами между растворимыми мономерами и

связанными с мембраной молекулами HLA-I, что свидетельствует об иммунорегуляторных функциях sHLA-I [357].

Изменения содержания мембранных и растворимых форм молекул главного комплекса гистосовместимости обнаружены при различных заболеваниях. При бронхиальной астме было выявлено повышение мембранных и растворимых форм антигена HLA-DR, отражающее активацию CD4⁺ лимфоцитов, В-лимфоцитов и свидетельствующее об участии молекул sHLA-DR в генезе аллергического воспаления в дыхательных путях [66, 67]. При ХОБЛ изменения сывороточного содержания растворимых молекул HLA-I, CD8, CD95 и их комплексов были ассоциированы с тяжестью бронхиальной обструкции, что может указывать на участие этих молекул в патогенезе бронхообструктивных нарушений [129, 179].

Растворимые формы молекул межклеточной адгезии

Формирование иммунного синапса при межклеточном взаимодействии в ходе иммунного ответа начинается с процессов адгезии. В осуществлении начальных этапов миграции клеток в очаг воспаления ключевая роль принадлежит молекулам межклеточной адгезии (Intercellular Adhesion Molecules – ICAM), которые экспрессированы на лейкоцитах, эпителиальных, покоящихся эндотелиальных и др. клетках [296].

Молекулы ICAM-3 (CD50) принимают участие в ранней межклеточной передаче сигнала и перестройке цитоскелета антиген-презентирующих клеток, стимулируют пролиферацию покоящихся Т-лимфоцитов. В результате взаимодействия ICAM-3 со своим лигандом LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) (CD11a/CD18) инициируется первичный контакт антиген-презентирующей клетки с Т-лимфоцитом [337]. Также молекулы ICAM-3 экспрессируются на тучных клетках и играют роль в их агрегации. Молекулы ICAM-3 участвуют в феномене адгезии нейтрофилов; стимуляция нейтрофилов сопровождается шеддингом ICAM-3 с поверхности клеток с образованием растворимой формы [319].

Молекула ICAM-1 (CD54) представляет собой трансмембранный протеин, экспрессированный преимущественно на лейкоцитах и эндотелиальных клетках, обеспечивающий стабилизацию межклеточных взаимодействий и эндотелиальную трансмиграцию активированных лейкоцитов и Т-лимфоцитов к месту воспаления [199]. Также ICAM-1 является ко-стимулирующей молекулой для антиген-презентирующих клеток и способствует последующей активации Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Учитывая участие этого протеина в воспалительных процессах и Т-клеточной защите, многие исследователи в последнее время рассматривают ICAM-1 в качестве сигнальной молекулы, вовлеченной в патогенез респираторных заболеваний [278]. Помимо этого, не так давно ICAM-1 был охарактеризован как рецептор для клеточного внедрения человеческого риновируса [306], самого распространенного возбудителя острых респираторных вирусных инфекций, которые являются частой причиной обострения ХОБЛ. Лигандами ICAM-1 являются антигены LFA-1, β 2-интегрин (CD18), Mac-1 (Macrophage-1 antigen, CD11b/CD18), растворимые молекулы фибриногена и др. Экспрессию генов молекул адгезии стимулируют разные факторы, включая окислительный стресс, воспалительные медиаторы (TNF- α , IL-1, интерферон- γ (ИФН- γ)) и т.д., а ингибируют кортикостероиды, сальбутамол и др. [187, 370]. Хорошо известно, что курение, индуцирующее окислительный стресс, способствует усилению ICAM-1/ β 2-интегрин зависимого рекрутирования клеток воспаления в легкие [205, 263]. Нейтрофильная инфильтрация легких, типичная для курильщиков, является также субстратом воспаления при ХОБЛ. Курение оказывает влияние на экспрессию молекул адгезии лейкоцитами, эпителиальными и эндотелиальными клетками легких и на высвобождение их растворимых форм [261, 368]. Большинство исследователей отмечает повышение уровня растворимых антигенов ICAM-1 и ICAM-3 в биологических жидкостях под воздействием курения, в том числе и пассивного, ассоциированное с оксидативным стрессом и нарушением антиоксидантной защиты [145]. Согласно другой точке зрения,

дисбаланс в системе адгезивных молекул при ХОБЛ не зависит от статуса курения и является характеристикой самого заболевания [236].

Растворимые молекулы адгезии связаны с основными иммунными и воспалительными процессами и реализуют свои биологические эффекты разными путями: осуществляя конкурентное ингибирование межклеточных взаимодействий, либо связываясь с соответствующим лигандом на поверхности клетки и индуцируя ответную реакцию. Было показано, что они обладают иммуномодулирующими свойствами, имеющими отношение к базовым патологическим процессам [340]. При патологических состояниях нарушается не только экспрессия мембранных форм ICAM-1 и ICAM-3, но и содержание их растворимых форм в биологических жидкостях. Ряд исследований сообщает о связи повышенного содержания sICAM-1 с риском атеротромбоза и сердечно-сосудистой летальности [393]. Высокий уровень sICAM-1 был зарегистрирован также при онкологических, аутоиммунных, аллергических заболеваниях, бактериальных и вирусных инфекциях и др. [83, 351].

Участие нарушений адгезии в патогенезе воспаления в дыхательных путях в настоящее время является предметом интенсивного изучения [241,278]. Было показано, что у крыс с индуцированной ХОБЛ снижение легочной функции ассоциировано с дисбалансом воспалительного каскада и усилением экспрессии ICAM-1 и IL-1 β в легочной ткани [383]. У больных ХОБЛ повышена экспрессия ICAM-1 в легочных фибробластах [252], а блокада легочной экспрессии ICAM-1 способна уменьшить повреждение легких в экспериментальных условиях [188].

Было обнаружено участие растворимых молекул адгезии в генезе как инфекционного, так и аллергического воспаления. У пациентов ХОБЛ установлена корреляция между концентрациями sICAM-1 в бронхоальвеолярной жидкости и содержанием маркера зрелых моноцитов/макрофагов sCD14, повышение которого ассоциировано с инфекционным воспалением [342]. С другой стороны, сигналы от ICAM-1 и его лиганда ведут к активации эозинофилов, усилению в них окислительного метаболизма и дегрануляции эозинофильных гранул [255]. У

больных бронхиальной астмой содержание растворимых форм антигенов ICAM-3 и ICAM-1 в сыворотке повышается и коррелирует с активностью воспалительного процесса в дыхательных путях, тяжестью заболевания и показателями легочной функции [29, 67, 267, 342]. Вместе с тем, сывороточный уровень растворимых молекул ICAM-1 может рассматриваться в качестве биомаркера массивного легочного фиброза, как было показано у больных пневмокониозом [279].

Интересны результаты популяционных исследований. Пятилетние наблюдения за 1865 участниками исследования MESA-Lung, дополнительной ветви обсервационного исследования MESA (The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) по изучению эндотелиальной дисфункции, биомаркеров и функции внешнего дыхания, показали, что нарастание в динамике уровня sICAM-1 является маркером прогрессирования эмфиземы легких и снижения легочной функции в генеральной популяции [266]. Мета-анализ данных 7 популяционных исследований, включавших более 9 тыс. участников, также выявили отрицательную корреляцию между уровнем sICAM-1 и ОФВ₁ [161].

Несмотря на то, что участие адгезивных молекул в патогенезе бронхообструктивных заболеваний в настоящее время является предметом интенсивного изучения, данные о содержании этих антигенов у больных ХОБЛ противоречивы. Так, результаты проведенного О.О. Михалевой (2008) исследования позволили установить связь уровня растворимых молекул адгезии с характером бактериальной и микотической сенсibilизации и выявили повышение содержания sICAM-3 у больных тяжелой ХОБЛ [78]. Н.И. Кубышева (2012) обнаружила, что при прогрессировании ХОБЛ на фоне снижения относительного количества CD54- и CD50-позитивных мононуклеарных клеток в периферической крови и индуцированной мокроте происходит увеличение уровня растворимых антигенов CD54 и CD50, коррелирующее с нарастанием бронхиальной обструкции [63]. В работах других авторов, напротив, при тяжелой и очень тяжелой ХОБЛ (ОФВ₁ 33,5 ± 2,8% должного) независимо от фазы заболевания было выявлено низкое содержание молекул sICAM-1 по сравнению с контрольной группой, а при

обострении наблюдалось и снижение экспрессии их лигандов – антигенов LFA-1 и Mac-1, что может указывать на эндотелиальную дисфункцию [238]. Также Н.А. Любавина и др. (2012) показала, что низкий уровень sICAM-1 ассоциирован с тяжелым течением ХОБЛ и более высокой бактериальной обсемененностью респираторного тракта [66]. Возможно, нарушения процессов адгезии лежат в основе ослабленной фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов, характерной для больных ХОБЛ [258].

Таким образом, молекулы адгезии играют важную роль в поддержании нормальной структуры и функции легких, принимают участие в таких процессах, как воспаление, противомикробная защита, регенерация тканей, распространение злокачественных опухолей. Растворимые формы этих молекул служат маркерами воспаления и эндотелиальной дисфункции при разных патологических процессах, однако, их значение при ХОБЛ требует дальнейшего изучения.

Растворимые формы активационных антигенов CD25 и CD38, их роль при бронхообструктивных заболеваниях

При антигенной и митогенной стимуляции лимфоцитов продуцируются определенные мембранные белки – активационные антигены. Такими активационными маркерами являются молекулы CD38 и CD25. Экспрессия мембранных форм и концентрации растворимых форм этих белков изменяются при онкогематологических, инфекционных заболеваниях, болезнях респираторного тракта.

Молекулы CD38 экспрессированы на поверхности многих клеток иммунной системы, включая CD4⁺ и CD8⁺ клетки, В-лимфоциты, натуральные киллеры. Антиген CD38 является полифункциональным эктоэнзимом и вовлечен в регуляцию внутриклеточного транспорта Ca⁺⁺ и сигнальную трансдукцию. У CD38-«нокаутных» мышей ослаблен внутриклеточный кальциевый ответ на агонисты, и снижена реакция дыхательных путей на метахолин [165]. Участвуя в мобилизации внутриклеточного кальция в гладкомышечных клетках дыхательных путей, молекулы CD38 играют важную роль в развитии бронхиальной обструкции

и формировании гиперреактивности бронхов, что имеет значение в патогенезе бронхиальной астмы и ХОБЛ [197].

Кроме того, нельзя недооценивать иммунологические функции CD38. Исследования F.E. Lund (2006) показали, что экспрессия CD38 клетками иммунной системы необходима для реализации воспалительных и иммунных реакций, кульминацией которых является развитие аллергии и гиперреактивности бронхов [283]. Было показано, что у мышей, дефицитных по CD38, иммунный ответ на аллергены ослаблен [318]. Анализ литературных данных подтверждает ключевую роль антигена CD38 в патогенезе бронхообструктивных заболеваний благодаря его двойной функции, заключающейся во влиянии на аллергический иммунный ответ и на сократительную способность гладкомышечных клеток [198].

Также известно, что CD38 может выполнять функции молекулы адгезии. Его роль зависит от типа клеток, стадии клеточной дифференцировки и характера микроокружения. Экспрессия молекул CD38 и их ферментативная активность стимулируются интерлейкином-13 и TNF- α – цитокинами, которые участвуют в патогенезе воспалительных заболеваний дыхательных путей, влияя на активность фактора транскрипции NF- κ B, контролирующего большую группу генов, ответственных за иммунный ответ, клеточную пролиферацию и воспаление [293, 321]. Дексаметазон снижает индуцированную провоспалительными цитокинами (фактором некроза опухоли- α) экспрессию CD38 как на транскрипционном уровне, ингибируя активность ядерного фактора NF- κ B, так и на посттранскрипционном уровне, влияя на стабильность транскриптов. Также и обнаружение глюкокортикоид-чувствительных элементов в промоторном регионе гена CD38 создает базис для стероидной регуляции экспрессии CD38 путем влияния на транскрипцию [321].

Было установлено, что растворимые формы антигена CD38 присутствуют в различных биологических жидкостях организма. При патологии меняется содержание как мембранных, так и растворимых форм CD38. Так, у больных atopической бронхиальной астмой обнаружено повышение экспрессии антигена

CD38 на мембранах предшественников плазматических клеток, отражающее активацию В-клеточного звена иммунитета [69, 165].

Еще одним важным активационным антигеном является CD25 – маркер альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 (interleukin-2, IL-2), появление которой в составе рецептора ведет к 100-кратному повышению его аффинности к интерлейкину-2. Наличие полноценной функциональной системы – интерлейкин-2/рецептор интерлейкина-2 – является решающим моментом в запуске пролиферации Т-лимфоцитов и индукции иммунного ответа [76]. В состоянии покоя лимфоциты и моноциты экспрессируют небольшое количество молекул CD25, но при активации клеток происходит усиление экспрессии этого антигена. Кроме того, молекула CD25 является маркером Т-регуляторных CD4⁺CD25⁺ клеток, которые контролируют функции эффекторных Т-клеток и играют важную роль в блокаде аутоиммунных процессов [133].

Содержание растворимых форм CD25, образующихся, в основном, путем шеддинга, отражает уровень поверхностной экспрессии рецептора IL-2 и позволяет судить об интенсивности активации Т-лимфоцитов. В то же время по механизму отрицательной обратной связи растворимый CD25 антиген способен ингибировать иммунные реакции, препятствуя гиперактивации иммунной системы и обуславливая формирование иммунологической толерантности. Так было показано, что усиленное слущивание и взаимодействие растворимого протеина sCD25 со своим лигандом IL-2 приводит к угнетению Т-клеточных реакций [196], хотя другие авторы считают, что решающую роль в конкурентном связывании IL-2 и иммуносупрессии играют мембранные гомологи CD25 на Т-регуляторных CD4⁺CD25⁺ клетках [308].

Было установлено, что при atopической бронхиальной астме увеличивается содержание растворимых форм CD25 в сыворотке крови и экспрессия этих антигенов клетками крови и индуцированной мокроты, коррелируя с тяжестью заболевания [44, 96, 343]. Кортикостероиды угнетают продукцию интерлейкина-2 и его рецептора, что ведет к уменьшению IL-2 зависимого фосфорилирования

белков и подавлению пролиферации Т-лимфоцитов. Под действием ГК снижаются концентрации sCD25 в сыворотке крови [232], а также уменьшается экспрессия мембранных форм и содержание растворимых форм CD25 в индуцированной мокроте, причем наиболее выраженный эффект дает сочетание ингаляционных и системных ГК, и комбинация их с теофиллинами [96, 115, 364].

На настоящий момент имеются лишь единичные исследования мембранных и растворимых форм активационных антигенов CD25 и CD38 у больных ХОБЛ. Были получены противоречивые результаты о нарушениях мембранной экспрессии молекул CD25 клетками индуцированной мокроты при обострении ХОБЛ [96, 115]. Также неоднозначны данные об изменениях содержания растворимых форм CD38 и CD25. С одной стороны, было выявлено повышенное содержание этих протеинов в конденсате выдыхаемого воздуха и периферической крови на ранних стадиях заболевания и нормальное – при тяжелой ХОБЛ [63]. Другие исследования показали, что маркером неблагоприятного течения ХОБЛ является пониженный уровень сывороточных молекул sCD38 и sCD25 [66]. Однако, в эти исследования не включались пациенты крайне тяжелой ХОБЛ. В связи с отсутствием данных, касающихся больных очень тяжелой ХОБЛ, а также разных фенотипов ХОБЛ необходимо дальнейшее изучение этого вопроса.

Растворимые формы дифференцировочных маркеров моноклеарных клеток CD8, CD16, CD14

Молекулы CD8 присутствуют на мембране цитотоксических Т-лимфоцитов и части натуральных киллеров. Антиген CD8 представляет собой ко-рецептор Т-клеточного рецептора и обеспечивает распознавание антигенов, презентруемых с участием молекул гистосовместимости I класса. Растворимые формы молекул CD8 продуцируются активированными цитотоксическими Т-лимфоцитами и служат маркерами их активации. Способность растворимого антигена CD8 взаимодействовать с мембранными и растворимыми молекулами HLA-I определяет его иммуномодулирующие свойства [190]. Связываясь с молекулами

HLA-I, растворимые формы CD8 препятствуют активации и пролиферации CD8⁺ клеток и тормозят их цитотоксические функции [352].

У больных бронхиальной астмой содержание CD8⁺ клеток в периферической крови и индуцированной мокроте определялось патогенетическим вариантом и фазой течения заболевания: при неаллергическом фенотипе и, особенно, в фазе обострения – увеличивалось, а при аллергической астме и в период ремиссии – снижалось [44, 47, 65, 96]. С другой стороны, у больных аллергическими заболеваниями дыхательных путей с бактериальной сенсibilизацией было выявлено повышение мембранной экспрессии антигенов CD8 и CD25 лимфоцитами крови [12].

Известно, что в генезе воспаления дыхательных путей при ХОБЛ цитотоксические CD8⁺ лимфоциты играют важную роль, и содержание их по данным гистопатологических исследований повышено во всех отделах легких. В индуцированной мокроте больных ХОБЛ также обнаружено увеличение количества CD8⁺ лимфоцитов, коррелирующее с тяжестью заболевания [96]. Повышение содержания CD8⁺ лимфоцитов считают биологическим маркером ХОБЛ, причем у больных ХОБЛ CD8⁺ Т-лимфоциты активированы абnormally и способны продуцировать провоспалительные медиаторы смешанного Th1 и Th2 профиля, а тяжесть ХОБЛ коррелирует с частотой активации CD8⁺ Т-клеток и продукцией ими ИФН- γ [309]. При этом курение и использование кортикостероидов оказывают ингибирующее влияние на число активированных CD8⁺ лимфоцитов при ХОБЛ.

Антиген CD16 является низкоаффинным рецептором константного участка иммуноглобулина G (Fc-рецептор III типа); связывание его с Fc фрагментом IgG ведет к активации NK-клеток и осуществлению антитело-зависимой клеточной цитотоксичности. Идентифицированы 2 вида рецепторов CD16 - Fc γ RIIIa (CD16a), присутствующий на натуральных киллерах, части Т-лимфоцитов, моноцитов и макрофагов, и Fc γ RIIIb (CD16b), который экспрессируется исключительно на нейтрофилах и может быть индуцирован на эозинофилах. Растворимые молекулы

sCD16 образуются, в основном, путем шеддинга с участием сериновых протеаз и металлопротеаз [320], которые активируются при различных патологических состояниях, в том числе в условиях индуцированного курением оксидативного стресса. В эксперименте было показано, что высвобождение s-форм происходит после активации НК-клеток и макрофагов, а также при стимуляции и апоптозе нейтрофилов, так что появление растворимых рецепторов означает активацию соответствующих клеток [226]. Растворимые формы CD16 участвуют в регуляции продукции воспалительных цитокинов, способны модифицировать активность мононуклеарных клеток и морфофункциональное состояние дендритных клеток [83]. В последние годы было показано, что sCD16 может рассматриваться как прогностический маркер при атеросклерозе, маркер активности воспаления при ревматоидном артрите и нефрите [287].

Разными авторами было показано, что натуральные киллеры, наряду с другими клеточными элементами, принимают участие в развитии воспаления при ХОБЛ и бронхиальной астме [184, 299]. Для НК-клеток легких характерен преимущественно «цитотоксический» CD56⁺CD16⁺ фенотип. Обсуждается потенциальная роль натуральных киллеров в развитии эмфиземы легких, поскольку они могут проявлять спонтанную цитотоксичность в отношении аутологичных структурных клеток легочной ткани, что в наибольшей степени было выражено при тяжелой ХОБЛ [254]. В.А. Невзорова и соавторы (2003) обнаружили у больных с обструктивными заболеваниями легких изменения экспрессии антигенных детерминант CD16, CD25, CD95 и HLA-DR клетками индуцированной мокроты, зависящие от фазы заболевания и проводимой терапии [115]. Вместе с тем, исследований роли растворимых форм CD16 антигена при бронхообструктивных заболеваниях недостаточно.

Антиген CD14 экспрессирован, в основном, на поверхности клеток миеломоноцитарного ряда и является маркером зрелых моноцитов/макрофагов. Он входит в состав высокоаффинного рецепторного комплекса, распознающего бактериальный липополисахарид (ЛПС), характерный для Грамм-отрицательных

бактерий. Компонентами этого комплекса являются антиген CD14, ЛПС-связывающий протеин, Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) и белок MD-2 (миелоидный фактор дифференцировки). Сигнальный комплекс TLR4/MD-2 связывает бактериальный ЛПС, и это взаимодействие усиливают антиген CD14 и ЛПС-связывающий протеин. Сигналы от Toll-подобных рецепторов ведут к активации NF-κB пути и тем самым к продукции и высвобождению провоспалительных цитокинов и хемокинов [390]. Было показано, что в респираторном тракте экспрессия мембранного антигена CD14 зависит от происхождения клеток: альвеолярный эпителий является CD14-негативным, в то время как эпителиальные клетки бронхов – CD14-позитивны [332]. Антиген CD14 опосредует фагоцитоз бактерий, клиренс апоптотических клеток, транспорт липидов [390]. Исследования с использованием «нокаутных» мышей показали, что ЛПС и CD14 играют важную роль в освобождении организма от инфекции [373]. Растворимая форма CD14 образуется путем шеддинга антигена с поверхности макрофага, осуществляемого с участием катепсина D, эластазы, а также матриксных металлопротеаз [361], высокий уровень которых характерен для ХОБЛ и эмфиземы легких. Экспериментальным путем было показано, что растворимый CD14 оказывает двойственное действие. С одной стороны, sCD14 опосредует ЛПС-зависимую активацию клеток, на мембранах которых не экспрессируется рецептор CD14 (например, эндотелиальных и эпителиальных клеток): sCD14 участвует в трансфере ЛПС с помощью ЛПС-связывающего белка; образующийся при этом комплекс sCD14-ЛПС может взаимодействовать с клеточным рецептором. С другой стороны, растворимый CD14 конкурирует со своим мембранным гомологом за ЛПС и усиливает его перенос на липопротеины плазмы, что ведет к торможению ЛПС-индуцированной клеточной активности [395].

Исследования *in vivo* продемонстрировали, что растворимый CD14 обладает системным противовоспалительным и местным провоспалительным эффектом. Этот двойственный механизм действия, стимулируя воспалительную реакцию в очаге и усиливая нейтрализацию и выведение бактериального ЛПС [191],

предотвращает при этом избыточный системный ответ на бактериальные ЛПС и защищает от развития эндотоксического шока [83]. Также известно, что sCD14 повышается при воспалительных состояниях как острофазовый маркер, и его уровень коррелирует с тяжестью заболевания и концентрацией других белков воспаления [195, 377]. Избыточное содержание sCD14 в циркуляции связано с инфекционным воспалением и Грам-негативным септическим шоком [280]. У курильщиков и пациентов с ХОБЛ обнаружено повышение экспрессии антигена CD14 нейтрофилами мокроты и альвеолярными макрофагами по сравнению с некурящими субъектами [380], а также увеличение уровня sCD14 и ЛПС-связывающего протеина в бронхоальвеолярной жидкости [281], причем эти белки способствуют подавлению активации клеток, вызванной бактериальными эндотоксинами, но не нарушают клиренс и интернализацию патогенов эпителиальными клетками дыхательных путей. При ХОБЛ была выявлена положительная корреляционная связь между уровнем sCD14 в бронхоальвеолярной жидкости и содержанием молекул адгезии sICAM-1, а при бронхиальной астме – между сывороточным sCD14 и концентрацией ингибитора секреторной лейкоцитарной пептидазы [342], который в дыхательных путях ингибирует до 50% нейтрофильной эластазы, препятствуя чрезмерному протеолизу, а также обладает противовоспалительным и антибактериальным действием [1].

Растворимые формы рецептора смерти CD95 (Fas/Apo-1)

Среди различных моделей клеточной гибели для иммунной системы большое значение имеет CD95 (Fas/Apo-1) -опосредованный апоптоз, который представляет собой регуляторный механизм, препятствующий накоплению эффекторных клеток и неконтролируемой продукции медиаторов. У человека экспрессия антигена CD95 обнаруживается на кортикальных тимоцитах, активированных Т- и В- лимфоцитах, моноцитах и нейтрофилах, а также клетках вне иммунной системы. Растворимые формы CD95 антигена, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК, выполняют функции модуляторов апоптоза. Мономерные растворимые

протеины sCD95 блокируют апоптоз, связываясь с Fas-лигандом на поверхности клеток; олигомерные формы sCD95 проявляют цитотоксическое действие [83, 305]. Содержание растворимой формы Fas молекулы активно изучалось при опухолевых, аутоиммунных, инфекционных и др. заболеваниях [28, 49, 353]. Динамика содержания sCD95 соотносится со степенью активности патологического процесса [28].

Также связанная с мембраной и растворимая формы Fas антигена были исследованы при бронхообструктивных заболеваниях, однако, полученные данные неоднозначны. При бронхиальной астме экспрессия Fas антигена на клетках индуцированной мокроты была повышена, а на лимфоцитах крови – снижена [44, 96]. В период сезонного обострения поллиноза и аллергической астмы наблюдалось снижение сывороточного содержания антиапоптотического фактора sFas и повышение его лиганда, проапоптотического фактора sFasL [341]. При умеренной ХОБЛ содержание как sCD95 антигена, так и CD95⁺ клеток в мокроте и конденсате выдыхаемого воздуха было повышено, в то время как при тяжелой ХОБЛ обнаружено увеличение относительного содержания CD95⁺ мононуклеарных клеток при снижении концентрации sCD95 в периферической крови [116]. Другой группой исследователей, напротив, обнаружено повышение sFas, ассоциированное с прогрессированием ХОБЛ [171].

Таким образом, изучение молекулярных биомаркеров при ХОБЛ не только внесет вклад в расшифровку патофизиологических механизмов, но и позволит более точно диагностировать различные фено- и эндотипические варианты ХОБЛ и прогнозировать эффективность терапии, а также создаст предпосылки для разработки таргетной терапии или «терапии цели», воздействующей на фундаментальные молекулярные механизмы, лежащие в основе разного рода заболеваний.

1.3. Роль инфекции в патогенезе хронической обструктивной болезни легких

Роль бактериальной инфекции в патогенезе ХОБЛ на протяжении десятилетий является предметом споров. Формирование современных представлений об инфекции при ХОБЛ прошло разные этапы от признания участия бактериальных агентов и гиперсекреции слизи в ухудшении легочной функции (Британская теория С. Stuart-Harris et al., 1953) [371] до доказательств отсутствия значимой связи рецидивирующих респираторных инфекций и хронического бронхита с прогрессирующим снижением ОФВ₁ (классическое исследование С. Fletcher et al., 1976) [374]. Вместе с тем, более поздние исследования, вопреки первоначальному описанию С. Fletcher et al., показали, что хроническая гиперсекреция слизи и рецидивирующие инфекции нижних дыхательных путей связаны с ускоренным снижением функции легких [269]. Одновременно с этим другие исследователи продемонстрировали значение микроорганизмов в развитии обострений и ухудшении функции легких [36, 253, 325]. Сегодня респираторные инфекции и хроническая обструктивная болезнь легких могут рассматриваться как коморбидные состояния, так как инфекции способствуют прогрессированию ХОБЛ, а ХОБЛ, со своей стороны, влияет на восприимчивость к инфекциям и их легочные проявления [317]. В настоящее время благодаря бронхоскопическим исследованиям доказана ведущая роль респираторных инфекций в качестве этиологических факторов обострений ХОБЛ, а также преобладающее значение бактериальной колонизации дыхательных путей у больных со стабильной фазой ХОБЛ [334, 346]. Таким образом, накопленные в настоящее время данные свидетельствуют, что бактериальная инфекция играет важную роль в патогенезе болезни, хотя изучены далеко не все механизмы, посредством которых это происходит [175, 248].

В частности, мало данных о взаимодействии назоорофарингеальной и трахеобронхиальной микрофлоры при ХОБЛ, хотя верхние и нижние дыхательные пути представляют собой единое анатомо-физиологическое целое и совместно

участвуют в осуществлении функции внешнего дыхания. Связь между верхними и нижними отделами респираторного тракта хорошо изучена при бронхиальной астме: у 78 - 87% пациентов с астмой, как аллергической, так неаллергической, имеется сопутствующий ринит или назальные симптомы, 10 – 40% больных аллергическим ринитом страдают астмой, и лечение риносинусита снижает частоту обострений астмы [31, 247, 298]. Однако роль верхних дыхательных путей (ВДП) и их микробиоценоз при ХОБЛ изучали лишь единичные исследователи. Оказалось, что у больных ХОБЛ назальные симптомы встречаются достаточно часто (в 75%), коррелируют с суточной продукцией мокроты и проявляют тенденцию к усилению при частых обострениях, хотя значимые взаимосвязи между назальными симптомами и ОФВ₁ отсутствовали [324]. По другим данным, напротив, степень назальной обструкции (по данным акустической ринометрии) при ХОБЛ отражает нарушение легочной вентиляции [297]. В эксперименте на кроличьей модели острого риносинусита было показано, что в ответ на локальную бактериальную инфекцию верхних дыхательных путей развивается генерализованное воспаление слизистых оболочек всех отделов респираторного тракта, поддерживая концепцию «единые дыхательные пути – единое заболевание» с точки зрения бактериальной инфекции [172]. Также в назальном секрете больных ХОБЛ был повышен уровень хемоаттрактанта нейтрофилов интерлейкина-8, коррелировавший и с его содержанием в мокроте, и с индексом бактериальной колонизации. Кроме того, пациенты с бактериальной колонизацией нижних дыхательных путей имели и более высокую назальную бактериальную нагрузку [326]. Недавние исследования микробиома (генома сообщества микроорганизмов, населяющих кожу и слизистые оболочки организма человека) выявили различия микробных сообществ ротовой полости у курильщиков и некурящих лиц [214]. Таким образом, несмотря на то, что симптомы назального воспаления и др. поражений ВДП нередко встречаются у больных ХОБЛ, взаимоотношения между микробиоценозом верхних и нижних отделов респираторного тракта, с учетом системного иммунного ответа мало изучены в настоящее время.

Также следует отметить, что этиологические факторы респираторных инфекций могут быть представлены нормальной микрофлорой верхних дыхательных путей (полости носа, зева, носо- и ротоглотки). Причем нормальные биоцинты могут играть как экранирующую, так защитную роль в отношении патогенных микроорганизмов, а в определенных условиях сами способны инициировать воспалительный процесс [71, 117]. Микроорганизмы, обладающие повышенной вирулентностью и патогенностью, при проникновении из верхних дыхательных путей в нижние, способны вызвать воспаление даже при минимальных нарушениях механизмов защиты.

Нормальная микрофлора человека состоит из облигатной (индигенной, аутохтонной, резидентной), которая доминирует, составляя 90%, факультативной (сопутствующей, добавочной), на долю которой приходится 9,5%, и транзитной (случайной, аллохтонной), встречающейся в 0,5% случаев [71, 110]. В составе микрофлоры зева и глотки у здоровых лиц, в основном, доминируют α -гемолитические стрептококки и нейссерии. Добавочная флора представлена стафилококками, гемофильной палочкой, коринебактериями и т.д. [64]. В качестве индигенной микрофлоры носа у взрослых выявляются коагулаза-негативные стафилококки и коринебактерии, добавочной флоры – микрококки, стрептококки, энтеробактерии и бациллы [97]. Транзитная флора зева и носа чаще всего представлена грибами рода *Candida*. Нормальная микрофлора выполняет важные функции, находясь в симбиозе с макроорганизмом, в том числе подавляет патогенную флору, вырабатывая низкомолекулярные метаболиты и антимикробные вещества. Слизистые оболочки организма хозяина обладают собственным защитным потенциалом, в котором важную роль играет мукоцилиарный клиренс, выработка слизи, уровень pH, редокс-потенциал, лизоцим, лактоферрин, иммунные факторы – секреторный IgA, фагоциты и лимфоциты. Защитные механизмы слизистых оболочек представляют собой продукт совместной деятельности аутохтонной микрофлоры и макроорганизма, в результате которой формируется «колонизационная резистентность» [18, 71].

Ведущая роль нормофлоры в поддержании микрoэкологического гомеостаза была в последние годы подтверждена молекулярно-генетическими исследованиями, которые существенно расширили наши представления о биоценозе респираторного тракта. Так, появление методов секвенирования нового поколения позволило установить, что нижние отделы дыхательных путей, которые длительное время считались стерильными, представляют собой динамическую экосистему микробиоты, тесно связанную с иммунным и воспалительным ответом хозяина и изменяющуюся при патологических состояниях [372]. Исследования пациентов ХОБЛ показали, что структура легочного микробиома зависит от возраста, индивидуального микробиома аэро-дигестивного тракта (глотка, пищевод и др.), а также от тяжести и фазы заболевания, использования кортикостероидов и антибиотиков и т.п. [173, 285]. Однако, несмотря на то, что современные генетические методы расширяют горизонты исследования микробиоты и повышают выявляемость микроорганизмов, традиционный посев на питательные среды и культивирование бактерий сохраняют свое значение, так как позволяют получать живые бактериальные культуры и дают возможность более глубоко изучать их свойства, например, чувствительность к антибактериальным препаратам, что широко применяется в клинической практике, а также другие характеристики, определяющие инвазивность, патогенность и способность микроорганизмов к персистенции.

Культуральные исследования бактериальной флоры нижних дыхательных путей при стабильной ХОБЛ, проведенные в течение нескольких последних десятилетий, неоднократно демонстрировали, что в отличие от «стерильных» (при использовании традиционных микробиологических методов) здоровых легких, в дыхательных путях больных ХОБЛ часто присутствуют бактерии [163], среди которых преимущественно выделяются основные респираторные патогены – нетипируемая *Haemophilus influenzae* (19 – 53,3%), *Streptococcus pneumoniae* (13 – 33,3%) и *Moraxella catarrhalis* (9 – 20%), реже обнаруживаются *Haemophilus parainfluenzae* (20%) и *Pseudomonas aeruginosa* (20%) [323, 334, 344].

Этиологическое значение энтеробактерий (*Klebsiella spp.* и др.) и псевдомонад возрастает на поздних стадиях заболевания, у пожилых пациентов с сопутствующими заболеваниями, при наличии бронхоэктазов [8, 143, 381].

Колонизация нижних дыхательных путей нередко сопровождается развитием хронической бронхиальной инфекции, которая имеет локальные и системные воспалительные проявления и характеризуется хронической продукцией мокроты (нередко гнойной); а также часто ассоциирована с бронхоэктазами, выделением *H. influenzae* и *Pseudomonas aeruginosa* в повторных посевах мокроты и связана с прогрессирующим снижением легочной функции, ухудшением состояния здоровья и склонностью к частым обострениям [239, 289]. Факторами риска инфекции *Pseudomonas aeruginosa* при ХОБЛ являются низкий ОФВ₁, лечение антибиотиками в предыдущие 3 месяца или 4 курса антибиотиков в течение года, системная кортикостероидная терапия [176] и как было показано недавно, выраженность бронхоэктазов [315]. Высокой вирулентностью отличаются мукоидные морфотипы *Pseudomonas aeruginosa*, для которых характерна полирезистентность к антибактериальным препаратам и способность к длительной персистенции [314].

Наличие бактериальной колонизации дыхательных путей в стабильной фазе модулирует характер, тяжесть и частоту обострений ХОБЛ. Так, при колонизации *Haemophilus influenzae* обострение ассоциировалось с выделением гнойной мокроты и большим количеством симптомов [323]. Кроме того, хроническая бактериальная колонизация дыхательных путей способствует персистенции воспаления [344], о чем свидетельствуют выявленные положительные корреляции общего микробного числа с количеством нейтрофилов и уровнем воспалительных маркеров (интерлейкина-8, лейкотриена LTB₄, миелопероксидазы) [177, 323]. Также обнаружена связь между степенью бронхиальной обструкции и микробной колонизацией дыхательных путей [162, 334]. Многими исследователями было установлено, что длительная терапия ингаляционными кортикостероидами при ХОБЛ вызывает нарушения иммунитета, способствует увеличению бактериальной

нагрузки в дыхательных путях и повышает риск пневмонии [17, 272, 384]. Эффективность длительной антибактериальной терапии (макролидами, моксифлоксацином) в профилактике обострений ХОБЛ также свидетельствуют о значимости микробной колонизации дыхательных путей в патогенезе заболевания [312, 381]. Однако при этом необходимо учитывать серьезный риск развития резистентности и нежелательных явлений, что требует соблюдения строгих показаний с целью индивидуализации терапии [5, 251, 290].

Таким образом, было показано, что бактериальная колонизация коррелирует с воспалительной реакцией, бронхообструктивными изменениями, рентгенологическими признаками бронхоэктазов, патологическими сдвигами местного и общего иммунного ответа и усилением симптомов ХОБЛ [317]. Эти наблюдения поддерживают гипотезу «порочного круга» хронической инфекции и воспаления, который способствует прогрессирующему снижению функции легких, даже после прекращения действия иницирующих факторов (курения), что характерно для ХОБЛ [144, 285].

Гипотеза «побочного круга», основанная на результатах традиционных микробиологических методов исследования, фокусируется на роли основных респираторных патогенов, как движущих факторов заболевания. Современные представления об экосистеме легочного микробиома вносят свой вклад в понимание патогенеза хронических заболеваний легких, связанных с инфекционными факторами. С этих позиций патологический процесс при ХОБЛ можно рассматривать не как следствие агрессивного бактериального вмешательства, а скорее, как дисбаланс нормальной микроэкосистемы легких [301, 345]. Исследования последних лет показали, что микроорганизмы-комменсалы способны модулировать воспалительный ответ, индуцированный потенциальными респираторными патогенами (*Haemophilus* spp., *Moraxella* spp.), ослабляя продукцию цитокинов и активацию дендритных клеток, и тем самым защищать легкие от воспалительного и оксидативного стресса [70, 301]. Недавно было установлено модулирующее действие курения на фенотип основных возбудителей

неспецифических бактериальных заболеваний легких [146] и респираторный микробиом [214]. Табачный дым и другие повреждающие факторы, оказывающие влияние на врожденный иммунитет, приводят к количественным сдвигам, изменению таксономического состава и филогенетического разнообразия микробиома легких. Это ведет к дезадапционной воспалительной реакции, дальнейшему нарушению иммунной защиты легких и расстройству респираторной микросистемы, устанавливая «порочный круг» со всеми вытекающими отсюда последствиями.

В этой связи одна из гипотез рассматривает обострения ХОБЛ как еще более выраженный локальный дисбиоз с усилением роли бактериальных патогенов, активацией местного и системного иммуновоспалительного ответа хозяина, ухудшением мукоцилиарного транспорта и проходимости дыхательных путей, что в свою очередь также способствует формированию еще одного «порочного круга». Как было показано в обзоре E. Sapey, R.A. Stockley (2006), инфекционные агенты (включая бактерии, атипичные микроорганизмы и вирусы) являются основной причиной обострений ХОБЛ (50–70% случаев), в 10% случаев обострения вызваны загрязнением воздуха и аэрополлютантами, при 30% обострений причина остается не установленной [338]. Среди инфекционных обострений ХОБЛ, примерно 50% обусловлены аэробными бактериями, 30% - вирусами, 5% - атипичными бактериями; ко-инфекция составляет около 15% [54, 111, 387]. При тяжелых обострениях, требующих вентиляционной поддержки, частота выявления патогенных бактерий превышает 70% [54, 192]. Ведущую роль бактериальной микрофлоры в генезе обострений ХОБЛ доказывают микробиологические исследования образцов, полученных при бронхоскопии с «защищенными» щетками, нейтрофильное воспаление дыхательных путей, ассоциированное с выделением бактериальных патогенов из мокроты, характер иммунного ответа хозяина и клинические испытания эффективности антибактериальных препаратов, показавшие, что бактериальная эрадикация ассоциируется с клиническими признаками разрешения обострения [135, 224, 329, 338].

Наиболее часто выделяются аэробные бактерии – основные респираторные патогены: *Haemophilus influenza* (около 11% среди всех обострений), *Streptococcus pneumoniae* (около 10%), *Moraxella catarrhalis* (около 10%), *Haemophilus parainfluenzae* (около 10%) [152, 338]. При тяжелых осложненных обострениях, в том числе требующих вентиляционной поддержки, при наличии сердечной недостаточности или другой сопутствующей патологии, возрастает этиологическая роль *Pseudomonas aeruginosa* и грамотрицательных энтеробактерий, чаще встречаются β -лактамаза-продуцирующие штаммы *Haemophilus Influenzae*, пенициллин-резистентные штаммы *Streptococcus pneumoniae*, а также преобладают микробные ассоциации [150, 192], что в некоторой степени можно объяснить предшествующей антибактериальной терапией, но с другой стороны, необходимы углубленные исследования иммунного ответа таких пациентов и его взаимосвязей с патогенными характеристиками микроорганизмов.

Обострения ХОБЛ, как правило, связаны с появлением в дыхательных путях новых антигенных штаммов внутри одного вида респираторных патогенов. Так, у больных, перенесших обострение, выявлялись штамм-специфические антитела к поверхностным эпитомам *H.influenzae* [360] и *Moraxella catarrhalis* [294]. Штамм-специфический иммунный ответ позволяет объяснить рецидивы обострений у больных ХОБЛ. В противовес этим данным другие авторы [164] считают, что 67% обострений вызваны самими колонизирующими штаммами, и в 86% случаев обнаружение новых штаммов не связано с обострением. Это противоречие можно объяснить сложными комплексными взаимодействиями между микрофлорой и организмом хозяина, различной патогенностью бактериальных штаммов, а также вариабельностью иммунного и воспалительного ответа пациентов. В настоящее время остается неясным, вызваны ли обострения колонизирующими штаммами, которые подверглись мутации, или внедрением новых штаммов или новых видов бактерий. При этом существуют доказательства, что у колонизированных пациентов наблюдаются более частые обострения, выраженная воспалительная реакция и, возможно, быстрое ухудшение функции легких [338]. Бактериальные

механизмы, которые способствуют усилению симптомов при обострении ХОБЛ, включают гиперсекрецию слизи, нарушение функции реснитчатого аппарата, повреждение эпителия, выброс провоспалительных медиаторов, рекрутирование лейкоцитов, секрецию протеиназ и другие факторы, которые ведут к дальнейшему прогрессированию заболевания.

Роль атипичных микроорганизмов при обострениях ХОБЛ изучена в меньшей степени. По данным ряда авторов *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* являются причиной обострений ХОБЛ в 5 – 10% случаев [54, 154]. Исследования на животных и *in vitro* выявили потенциальные механизмы развития обострений при инфекции атипичной флорой: липопроетины, выделенные из микоплазмы, способны активировать Toll-подобный рецептор 2, усиливая продукцию муцина [379], а хламидии могут стимулировать секрецию IL-1 β и ингибировать выработку антагониста рецептора IL-1, что ведет к усилению секвестрации клеток воспаления в дыхательных путях [256].

Вклад вирусов в этиологию обострений ХОБЛ составляет 20 – 40% [111, 331, 387]. Основными «виновниками» ухудшения симптоматики являются риновирусы, респираторно-синцитиальные вирусы, вирусы гриппа, метапневмовирусы и другие респираторные вирусы, частота выявления которых при обострениях многократно возрастает по сравнению со стабильной фазой [223]. Респираторно-синцитиальный вирус обладает тропностью к эпителию мелких дыхательных путей, также большинство респираторных вирусов действуют на бронхиальные адренергические и холинергические рецепторы, что обуславливает возникновение бронхиальной обструкции [330]. Повреждающее действие вирусов на различные факторы местной защиты легких предрасполагает к колонизации слизистой бактериями и вторичным бактериальным инфекциям нижних дыхательных путей. Так, после вирусных инфекций в мокроте больных часто выявляется персистенция *H. influenza* и *S. pneumonia* [39]. Вирусная инфекция, особенно при наличии хронической бактериальной колонизации дыхательных путей, является важным фактором, определяющим тяжесть обострения ХОБЛ и бронхиальной астмы; у

пациентов с ко-инфекцией выше вероятность госпитализации по поводу обострения [386]. Таким образом, респираторная вирусная инфекция, как правило, является прологом развития бактериальной инфекции трахеобронхиального дерева при ХОБЛ. Кроме того, латентная вирусная инфекция вносит немаловажный вклад в повреждение легочной ткани. Так, было обнаружено, что степень воспаления и эмфизематозной деструкции легких коррелирует с уровнем экспрессии аденовирусного протеина эпителиальными клетками [170], а также в животных моделях персистирующая аденовирусная инфекция ассоциировалась с усилением легочного повреждения, индуцированного курением [235].

Грибковая составляющая микробиоценоза респираторного тракта в отличие от бактериальной в большей степени зависит от микроокружения, характера питания, воздействия внешних факторов и т.п. Кроме того, значение грибковой микрофлоры возрастает после антибактериальной терапии, когда вследствие ослабления колонизационной резистентности формируется колонизация дыхательных путей, сопровождающаяся воспалительной реакцией, изменениями микробных взаимодействий и взаимоотношений макро- и микроорганизма [60, 286].

Существует еще один аспект взаимоотношений организма хозяина с инфекционными агентами при ХОБЛ. Было показано, что наличие ХОБЛ предрасполагает к развитию внебольничной пневмонии, может влиять на ее этиологию, эффективность лечения и исходы. Высокая частота пневмоний у больных ХОБЛ обусловлена нарушениями иммунного статуса и проводимой противовоспалительной терапией (в первую очередь, кортикостероидной), которая усугубляет иммунные нарушения [182, 272].

Несмотря на то, что микробная агрессия является этиологической основой обострений ХОБЛ, известно, что не всегда микробы вызывают болезнь. Нередко они существуют латентно, без прямой атаки на макроорганизм и манифестации инфекции, используя организм хозяина в качестве экониши и питательного субстрата. В этом случае речь идет о микробной персистенции, которая

представляет собой результат эволюционно закрепившихся взаимоотношений симбионтов в системе «паразит-хозяин» [70, 90].

В аналитическом обзоре В.А. Никифорова и др. (2010) систематизированы основные механизмы бактериальной персистенции [71], которые включают в себя: 1) факторы, обеспечивающие устойчивость к внешним агрессивным физико-химическим воздействиям (устойчивость к антибактериальным препаратам, адгезивность, способность формировать биопленки и др.) [22, 34, 86]; 2) механизмы, вызывающие нарушения в системе биоценоза (продукция бактериями лизоцима, протеолитических ферментов, ДНК- и РНК-азы, антилизоцимная, антиинтерфероновая, антикомплементарная, антииммуноглобулиновая активность бактерий и др.) [15, 70]; 3) механизмы, обеспечивающие резистентность к защитным системам хозяина (антигенная мимикрия, L-трансформация, некультивируемые формы, выработка токсинов, нарушения в системе апоптоза, изменение соотношения Т-хелперов I и II порядка, подавление пролиферации мононуклеарных клеток крови, устойчивость к нейтрофильному киллингу и др.) [48, 70]. В результате приобретения бактериями этих факторов они обеспечивают себе дополнительные преимущества для выживания на слизистых оболочках макроорганизма и формирования бактерионосительства.

В научной литературе представлены публикации, посвященные изучению факторов бактериальных персистенций, включая антилизоцимную (АЛЦ), антииммуноглобулиновую (АИГА), антилактоферриновую (АЛФА), антиинтерфероновую, антикомплементарную, антикарнозиновую, гемолитическую, протеолитическую и другую активность [10, 15, 70, 84] при ревматических заболеваниях, инфекциях нижних мочевых путей, желудочно-кишечного тракта и др. [35, 61, 93, 130]. Однако, исследований данных характеристик микрофлоры при патологии органов дыхания недостаточно.

Ряд авторов занимался изучением персистентных свойств микроорганизмов, полученных из верхних отделов респираторного тракта. Основываясь на степени выраженности антикарнозиновой активности штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*,

выделенных со слизистой носовой полости здоровых лиц, О.Л. Карташова и др. (2007) создали математическую модель для диагностики стафилококкового бактерионосительства [41]. Бактериальные патогены, выделенные со слизистой миндалин у детей с хроническим тонзиллитом, характеризовались широким распространением адгезивной способности и факторов персистенции (АЛА, антиинтерфероновая активность), причем факторы патогенности и АЛА при патологии были более выраженными по сравнению с микрофлорой здоровых детей [26]. У больных хроническим тонзиллитом на слизистой оболочке носа происходила селекция полирезистентных штаммов стафилококков, обладающих выраженными персистентными свойствами, которые способны вызвать обострение воспалительного процесса при транслокации на слизистую миндалин [136]. Стафилококки, выделенные у детей с рецидивирующими вирусными инфекциям верхних дыхательных путей и различными аллергическими заболеваниями, также проявляли более высокую АЛА, по сравнению с микрофлорой здоровых детей [112].

О.М. Абрамзон и др. (2003) изучали характеристики микрофлоры при острых заболеваниях плевры и легких. Как аэробные, так и анаэробные бактерии, выделенные из очага воспаления, проявляли антилизосимную и антикомплементарную активность, причем тяжелое течение заболевания ассоциировалось с усилением этих свойств условно-патогенных микроорганизмов в 1,7 – 2,4 раза по сравнению с обычным течением [137]. В.И. Седов и др. выделили из мокроты больных хроническом обструктивным бронхитом, которые длительно находились на стационарном лечении и использовали несколько антибиотиков, 12 штаммов энтерококков, характеризовавшихся резистентностью к стрептомицину и гентамицину и обладавших высоким патогенным потенциалом, выраженной гемолитической, протеолитической, плазмокоагулирующей, антилизосимной и гемагглютинирующей активностью. По мнению авторов, одинаковый набор факторов патогенности и антибиотикорезистентности может служить эпидемиологическим маркером и указывать на риск внутрибольничного

инфицирования энтерококками на определенном этапе стационарного лечения [149]. По данным нижегородских авторов культуры микроорганизмов, вегетирующих на слизистых дыхательных путей больных острыми и хроническими бронхолегочными заболеваниями, в разной степени проявляли АЛА и АИГА, а также обладали способностью к образованию биопленки [52]. Наиболее широким спектром активностей обладали бактерии, выделенные при хронических бронхитах и бронхиальной астме, по сравнению с острыми инфекционно-воспалительными заболеваниями, что позволило Г.К. Дегтевой и др. разработать способ прогнозирования тяжести хронических воспалительных заболеваний нижних дыхательных путей микробной этиологии [124].

Также было установлено, что различные факторы, в том числе и лекарственные препараты (антиоксиданты, иммуномодуляторы, пробиотики, гормональные и антибактериальные вещества), способны модифицировать факторы персистенции бактериальных патогенов, причем характер и степень этих изменений определяется, с одной стороны, строением и концентрацией лекарственных веществ, а с другой, видовой принадлежностью микроорганизмов [58, 59].

Дальнейшее изучение бактериальных факторов патогенности и персистенции при заболеваниях бронхолегочной системы является важной и перспективной задачей пульмонологии. Респираторные патогены, имеющие значение при ХОБЛ, используют различные механизмы уклонения от защитных реакций хозяина и благодаря этому способны вызывать острые и хронические инфекции. Иммунный ответ организма хозяина следует рассматривать не отдельно, а в совокупности с тканевым микроокружением и микробными «сожителями», поскольку как нарушение защитных свойств макроорганизма, так и особенности биологических характеристик микроорганизмов могут способствовать персистенции бактериальных патогенов и хронизации воспалительного процесса при ХОБЛ с рецидивирующими инфекционными обострениями. В этой связи актуальным является изучение биомаркеров – растворимых форм мембранных

антигенов иммунокомпетентных клеток (модуляторов апоптоза, молекул адгезии, маркеров активации клеток, молекул главного комплекса гистосовместимости, дифференцировочных антигенов) у больных ХОБЛ в комплексе с оценкой микробиологических и клинико-функциональных характеристик. Большое значение имеет также разработка путей оптимизации лечения больных ХОБЛ с учетом воздействия на выявленные патогенетические механизмы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе кафедры пропедевтики внутренних болезней федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации и пульмонологического отделения ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 10» г. Нижнего Новгорода. Иммунологические исследования с оценкой растворимых дифференцировочных антигенов лейкоцитов и молекул гистосовместимости проводились в Научно-исследовательском Центре молекулярной биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского». Микробиологическое исследование отделяемого со слизистых дыхательных путей осуществлялось в лаборатории микробиологии федерального государственного учреждения науки "Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом при ГБУЗ НО «Городская клиническая больница №10» (протокол №7 от 17 января 2012 года).

2.1. Дизайн исследования

Когорта обследованных включала 297 лиц: 257 больных ХОБЛ (143 пациента со стабильной фазой и 114 больных в фазе обострения) и 40 здоровых некурящих доноров.

В исследование включались пациенты старше 40 лет, с установленным ранее диагнозом ХОБЛ, бывшие или настоящие курильщики, при наличии информированного согласия. Не включались пациенты с бронхиальной астмой

(БА) (за исключением перекрест-синдрома астма-ХОБЛ), аллергическим ринитом; перенесшие инфекции дыхательных путей в течение последних 4-х недель; получавшие системные кортикостероиды (сГК) или антибиотики в течение последних 4-х недель; больные, нуждающиеся в инвазивной респираторной поддержке и лечении в реанимационном отделении; больные с другими заболеваниями нижних дыхательных путей (пневмония, тромбоэмболия легочной артерии, интерстициальные заболевания легких, альвеолиты и др.); с острыми и хроническими воспалительными заболеваниями в стадии обострения любой локализации; диффузными заболеваниями соединительной ткани (ревматоидный артрит, системная красная волчанка и др.) и другими аутоиммунными заболеваниями (сахарный диабет 1 типа, аутоиммунный тиреоидит, диффузный токсический зоб, аутоиммунная гемолитическая анемия, гломерулонефрит и др.); онкологическими заболеваниями; ВИЧ-инфекцией, вирусными гепатитами и циррозами печени; нестабильной ишемической болезнью сердца, тяжелыми декомпенсированными заболеваниями внутренних органов и другими состояниями, которые могли влиять на результаты исследования.

Диагноз ХОБЛ был установлен с учетом анамнеза и спирометрических данных в соответствии с критериями GOLD 2011 года [33] и Федеральных клинических рекомендаций по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких [131]. При диагностике перекрест-синдрома бронхиальная астма-ХОБЛ (БА-ХОБЛ) руководствовались критериями совместного проекта GINA и GOLD [225]. Обострением считали ухудшение респираторных симптомов (усиление одышки, кашля, продукции мокроты), выходящее за рамки ежедневных колебаний, которое требовало изменения режима терапии [33, 248]. Степень тяжести обострения классифицировали в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких [131]: легкая – требуется

увеличение объема терапии, которое может быть осуществлено силами больного (увеличение дозы короткодействующих бронходилататов по потребности); средняя – увеличение объема терапии, которое требует консультации врача (назначение системных ГК и/или антибиотиков); тяжелая – отмечается явное, быстрое ухудшение состояния пациента, требуется госпитализация. Частыми считались 2 и более обострения (среднетяжелых или тяжелых) за предыдущий год [362].

Этапы исследования

Этапы и дизайн исследования представлены на рисунке 1. На 1-м этапе проводилось предварительное общеклиническое обследование, которое включало сбор жалоб и анамнеза заболевания, объективное обследование, при необходимости – стандартное лабораторно-инструментальное обследование (общие анализы крови, мочи, мокроты, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, электрокардиография в 12-ти стандартных отведениях, доплер-эхокардиография и т.д.). На данном этапе оценивались критерии включения и невключения, осуществлялось собеседование с больными и получение информированного согласия на участие в исследовании. В зависимости от фазы заболевания пациенты распределялись на 2 ветви: стабильная фаза (143 пациента) и фаза обострения (114 пациентов).

При стабильной ХОБЛ пациенты на 2-м этапе проходили специальное обследование в соответствии с поставленными целями и задачами, которое включало заполнение вопросников, оценку интенсивности курения, спирометрию, иммунологическое исследование с изучением растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости в сыворотке крови, а также микроскопическое и микробиологическое исследование отделяемого со слизистых дыхательных путей с определением чувствительности к антибиотикам, факторов патогенности и персистенции микроорганизмов. Клинико-функциональное обследование проводилось у всех

больных. Содержание маркеров состояния иммунитета в сыворотке крови было изучено у 92 пациентов. Микробиологическое исследование отделяемого со слизистых дыхательных путей (однократное) с определением факторов патогенности и персистенции было выполнено у 118 пациентов.

На 3-м этапе проводилось наблюдение и лечение пациентов, на 4-м этапе – повторное клинико-функциональное и иммунологическое обследование. У 92 больных проводили мониторинг обострений в течение 6 месяцев; при развитии обострения осуществляли повторное исследование содержания растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости (29 больных – 10 женщин и 19 мужчин).

Сорок два пациента (13 женщин и 29 мужчин) со степенью тяжести GOLD III-IV и риском частых обострений, с индексом курения более 20 пачка-лет, были включены в открытое сравнительное рандомизированное исследование влияния дополнительной терапии рофлумастилом на частоту обострений ХОБЛ и на содержание растворимых дифференцировочных молекул лейкоцитов. Все больные получали «тройную терапию», включавшую М-холинолитик и β_2 -агонист/иГК. Пациенты были разделены на 2 группы методом «конвертов». В первую (основную) группу вошли 25 пациентов, которым дополнительно был назначен рофлумастил. Вторую группу (группу сравнения) составили 17 пациентов, которые получали только «тройную терапию» без рофлумастила. Наблюдение за больными продолжалось на протяжении 12-ти месяцев. Исследовалось число и длительность обострений и госпитализаций, динамика симптомов в оценочном тесте ХОБЛ (COPD Assessment Test, CAT-тест), а также ФВД и содержание растворимых форм мембранных антигенов иммунных клеток. Исследования проводились до начала приема изучаемой терапии и через 1, 3, 6 и 12 месяцев от начала приема.

При обострении ХОБЛ было изучено влияние различных видов применяемой терапии на клинико-функциональные тесты и содержание

растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов. В открытые сравнительные рандомизированные исследования включались пациенты старше 40 лет, с установленным ранее диагнозом ХОБЛ степени тяжести GOLD II-IV, с индексом курения не менее 20 пачка-лет, госпитализированные по поводу обострения в пульмонологическое отделение ГБУЗ НО «Городская клиническая больница №10».

На 2-м этапе при поступлении в стационар больным проводились общеклиническое обследование, общие клинические анализы крови, мочи, мокроты, биохимический анализ крови, также рентгенография или компьютерная томография грудной клетки и электрокардиография (если не были выполнены ранее), другие обследования при наличии показаний. Наряду с этим до начала терапии проводилось специальное обследование, включавшее изучение клинических симптомов (вопросник mMRC и САТ-тест, оценка выраженности респираторных симптомов в баллах), спирометрия, пульсоксиметрия и иммунологическое исследование с определением содержания растворимых дифференцировочных антигенов в сыворотке крови.

На 3-м этапе проводилось лечение обострения ХОБЛ. Больные получали комплексную терапию согласно стандартам оказания стационарной медицинской помощи взрослому населению Нижегородской области: кортикостероидную терапию, антибиотики (цефалоспорины 3 поколения, амоксициллин/клавулановая кислота, макролиды, респираторные фторхинолоны), бронходилататоры (β_2 -агонисты, М-холинолитики), эуфиллин, магния сульфат, муколитики (амброксол, ацетилцистеин) и, по показаниям, оксигенотерапию и неинвазивную вентиляцию легких.

С учетом тяжести обострения и наличия острой дыхательной недостаточности были выделены две ветви:

1. При обострении ХОБЛ, не осложненном острой дыхательной недостаточностью, проводилось открытое сравнительное рандомизированное

исследование эффективности и безопасности небулизированного будесонида и преднизолона, а также их влияния на сывороточный уровень растворимых дифференцировочных молекул лейкоцитов. Были включены 60 пациентов (21 женщина и 39 мужчин) с ХОБЛ степени тяжести GOLD II-III, которые получали лечение стационаре. Пациенты были рандомизированы на 2 группы методом конвертов. Пациенты 1-й группы (24 человека) получали ингаляционные кортикостероиды: будесонид (Пульмикорт суспензия, Астра Зенека) по 2 мг 2 раза в день через небулайзер Omron CompAir Pro NE-C900 (Omron, Япония). Пациентам 2-й группы (36 человек) назначался преднизолон в виде внутривенной инфузии 120 – 180 мг в день. Курс терапии кортикостероидами составлял 7 – 10 дней.

2. При тяжелом обострении ХОБЛ, осложненном острой дыхательной недостаточностью, в открытом сравнительном рандомизированном исследовании изучалось влияние неинвазивной механической вентиляции легких на клинико-функциональные параметры и сывороточное содержание растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов. В основную группу были включены 30 пациентов (13 женщин и 17 мужчин) с ХОБЛ степени тяжести GOLD III-IV, госпитализированные по поводу обострения. Дополнительными критериями включения являлись выраженная одышка с частотой дыхательных движений (ЧДД) ≥ 24 в минуту, с клиническими признаками утомления дыхательной мускулатуры и усиления работы органов дыхания (участие вспомогательных мышц, втяжение межреберных промежутков, абдоминальный парадокс и т.п.) и отсутствие противопоказаний к НВЛ [210]. Наряду со стандартной медикаментозной терапией в основной группе применялась НВЛ в режиме двухуровневой вентиляции с поддержкой давлением [6]. Для проведения НВЛ использовался аппарат VENTImotion 2, WEINMANN medical technology, Германия, режим *Spontaneous/Timed*. Группа

сравнения включала 24 пациента (10 женщин и 14 мужчин), сопоставимых по полу, возрасту и тяжести состояния, которые получали стандартную терапию.

На 4-м этапе проводилось повторное исследование после окончания курса терапии: изучалась динамика показателей ФВД и сывороточного содержания растворимых дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости. Оценка клинических данных и сатурации O_2 осуществлялась ежедневно. Также оценивались исходы заболевания и длительность госпитализации. В ветви сравнительного исследования небулизированного будесонида и преднизолона в течение 3 месяцев после выписки проводился мониторинг рецидивов обострений ХОБЛ, требующих повторной госпитализации.

1. Скрининг	Общеклиническое обследование, оценка критериев включения/невключения				
	Стабильная ХОБЛ (143 пациента)		Обострение ХОБЛ (114 пациентов)		
	GOLD I – 23 пациента GOLD II – 40 пациентов GOLD III – 48 пациентов GOLD IV – 32 пациента	Фенотипы: - с частыми обострениями (63 пациента) - БА-ХОБЛ (25 пациентов)	не осложненное дыхательной недостаточностью (60 пациентов)	осложненное дыхательной недостаточностью (54 пациента)	
	Некурящие доноры (40 человек)				
2. Обследование	Клинико-функциональные тесты: mMRC, CAT-тест, индекс курения, ФВД, SpO ₂ (при обострении) и т.д.				
	Маркеры состояния иммунитета: sCD95, sCD54, sCD50, sCD25, sCD38, sCD8, sCD16, sCD14, sHLA-I, sHLA-DR				
	Микробиологическое обследование: идентификация возбудителя, антибиотикорезистентность, патогенные и персистентные свойства				
3. Наблюдение / рандомизация и лечение	Мониторинг обострений в течение 6 месяцев (92 пациента)	Открытое сравнительное рандомизированное исследование дополнительной терапии рофлумиластом в течение 12 месяцев (42 пациента)		Открытые сравнительные рандомизированные исследования	
		Рофлумиласт + «тройная» терапия (25 пациентов)	«Тройная» терапия (17 пациентов)	Обострение ХОБЛ, не осложненное дыхательной недостаточностью (60 пациентов)	Обострение ХОБЛ, осложненное дыхательной недостаточностью (54 пациента)
		Будесонид через небулайзер (24 пациента)	Преднизолон внутривенно (36 пациентов)	НВЛ + Стандартная терапия (30 пациентов)	Стандартная терапия (24 пациента)
		Курс терапии: 7 – 10 дней		Курс терапии: 11 – 17 дней	
4. Повторное обследование	Маркеры состояния иммунитета при обострении (29 пациентов)	Число и длительность обострений и госпитализаций, динамика симптомов, ФВД, маркеров состояния иммунитета через 1, 3, 6, 12 месяцев		Симптомы, ФВД, SpO₂, маркеры состояния иммунитета после курса терапии	
				Мониторинг обострений и госпитализаций в течение 3-х месяцев	

Рисунок 1. Дизайн и этапы исследования

2.2. Исходные характеристики больных

Исходные характеристики больных представлены в таблице 1. В исследование было включено 257 пациентов (143 пациента в стабильной фазе ХОБЛ, в возрасте 40 – 82 лет, из них 69,9% мужчин, и 114 больных в фазе обострения в возрасте 44 – 78 лет, из них 61,4% мужчины). Длительность заболевания (по данным первичной медицинской документации) составила от 3 до 50 лет, в среднем – $17,7 \pm 10,2$ лет. Все больные были настоящими или бывшими курильщиками со средним индексом курения $36,6 \pm 9,1$ пачка-лет.

Таблица 1

Исходные характеристики больных ХОБЛ
($M \pm SD$; количество (%) больных)

Показатель	ХОБЛ, стабильная фаза (143 человека)	ХОБЛ, фаза обострения (114 человек)
Возраст, лет	$61,6 \pm 10,6$	$62,6 \pm 9,8$
Женщины/Мужчины	43/100	44/70
Длительность заболевания, лет	$18,5 \pm 13,4$	$17,3 \pm 6,1$
<i>Статус и интенсивность курения</i>		
Настоящие курильщики	98 (68,5)	82 (71,9)
Бывшие курильщики	45 (31,5)	32 (28,1)
Индекс курения, пачка-лет	$36,8 \pm 16,3$	$35,6 \pm 8,7$
<i>Степень тяжести ХОБЛ</i>		
GOLD I	23 (16,1)	-
GOLD II	40 (27,9)	37 (32,5)
GOLD III	48 (33,6)	50 (43,9)
GOLD IV	32 (22,4)	27 (23,7)
Число обострений в год	$1,78 \pm 1,05$	$2,08 \pm 1,54$
Гипертрофия правых отделов сердца	61 (42,7)	68 (59,6)
<i>Сопутствующие заболевания</i>		
ИБС, артериальная гипертония	75 (52,4)	70 (61,4)
Сахарный диабет 2 типа, нарушение толерантности к глюкозе	21 (14,7)	27 (23,7)

Больные в стабильной фазе ХОБЛ в большинстве случаев (61,5%) имели степень тяжести GOLD II или GOLD III. Более подробно исходные

спирометрические характеристики больных со стабильной фазой заболевания представлены в таблице 2; ОФВ₁ составил, в среднем, 1,57±0,98 л.

Таблица 2

Исходные спирометрические характеристики больных стабильной ХОБЛ
(постбронходилатационные показатели, М±SD)

Показатели ФВД, % должной величины	Все больные (n=143)	GOLD I (n=23)	GOLD II (n=40)	GOLD III (n=48)	GOLD IV (n=32)
ЖЕЛ	71±19	100±22	73±13	66±14	61±9
ФЖЕЛ	60±24	88±13	62±6	42 ±7	29±7
ОФВ ₁	48±27	101±24	65±9	37±10	26±9
Модифицированный индекс Тиффно, %	55±19	68±8	66±11	53±17	48±9
ПОС	41±19	68±25	42 ±18	33±11	27±7
МОС ₂₅	61±49	158±50	46±26	45±15	26±9
МОС ₅₀	23±24	73±31	32±11	15±10	10±4
МОС ₇₅	24±23	72±16	40±16	16±12	11±5

При комплексной оценке ХОБЛ с учетом симптомов и риска обострений (по GOLD 2011-2016) [33, 248] к группе А относились 20 пациентов, к группе В – 43 больных, С – 34 больных и D – 46 больных стабильной ХОБЛ, т.е. наиболее часто встречались пациенты групп В и D (рисунок 2).

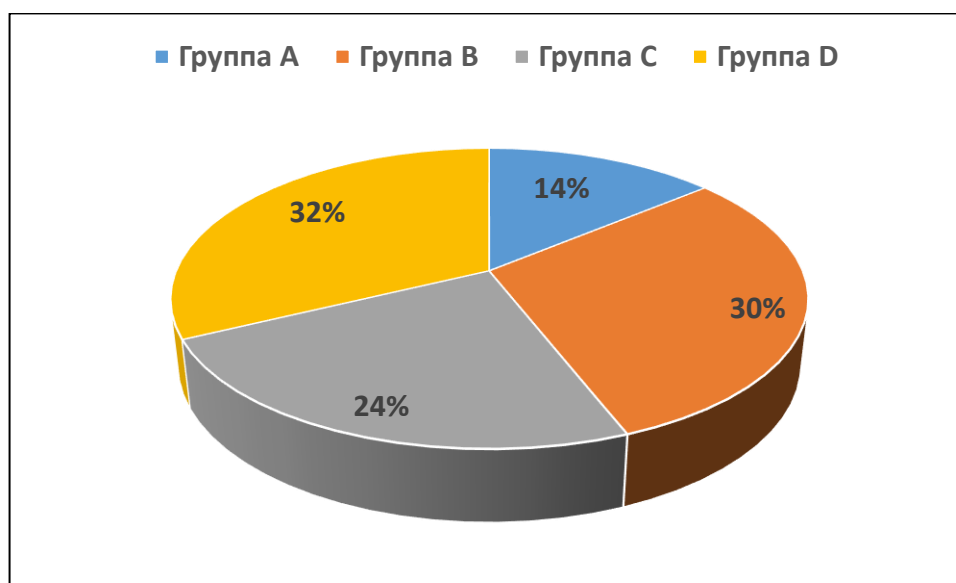


Рисунок 2. Распределение больных по группам А – D на основе интегральной оценки ХОБЛ (GOLD, 2011-2016)

Самым частым был смешанный эмфизематозно-бронхитический фенотип ХОБЛ (80 пациентов, 55,9%), у 24 (16,8%) пациентов был диагностирован бронхитический, у 14 (9,8%) больных – эмфизематозный вариант. Фенотип перекрест-синдрома астма-ХОБЛ был диагностирован у 25 (17,5%) пациентов. Среди них у 16 больных диагноз бронхиальной астмы предшествовал ХОБЛ; неконтролируемое течение БА наблюдалось у 14 пациентов, частично-контролируемое – у 11 больных. Частые обострения (2 и более за предыдущий год) были зарегистрированы у 63 (44,1%) больных.

Признаки ремоделирования правых отделов сердца отмечались у 42,7% обследованных пациентов со стабильной фазой заболевания. Наиболее частой сопутствующей патологией были заболевания сердечно-сосудистой системы (ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертония), которые встречались у 52,4% пациентов. Нарушения углеводного обмена (сахарный диабет 2 типа, нарушение толерантности к глюкозе) наблюдались у 14,7% пациентов.

Иммунологическое исследование с определением содержания растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов и молекул гистосовместимости было проведено у 92 пациентов (21 женщина и 71 мужчина, возраст $61,7 \pm 10,2$ лет, индекс курения $34,9 \pm 15,1$ пачка-лет).

Микробиологическое исследование мокроты было проведено у 118 больных ХОБЛ (31 женщина и 87 мужчин; возраст $60,1 \pm 9,8$ лет; индекс курения $36,3 \pm 10,1$ пачка-лет), среди них у 31 больного проводился также посев жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Наряду с этим у 109 больных было проведено бактериологическое исследование отделяемого со слизистых зева, и у 104 больных – со слизистых носа. Среди пациентов с микробиологическим исследованием степень тяжести GOLD I-II определялась у 63 человек, GOLD III-IV – у 55 пациентов; средний ОФВ₁ составил $62,5 \pm 24,8\%$ от должной величины.

На момент включения в исследование больные со стабильной фазой ХОБЛ получали следующую ингаляционную терапию: только короткодействующие бронходилататоры – 14 (9,8%) пациентов, длительно действующие

бронходилататоры – М-холинолитики и/или β 2-агонисты – 70 (49%) пациентов, фиксированные или свободные комбинации иГК и β 2-агонистов – 17 (11,9%) пациентов, «тройную» терапию (М-холинолитик, β 2-агонист и иГК) – 42 (29,4%) пациентов.

Исходная характеристика 42 больных стабильной ХОБЛ, включенных в исследование влияния дополнительной терапии рофлумиластом на частоту обострений ХОБЛ и на содержание растворимых форм мембранных молекул клеток иммунной системы, представлена в таблице 3. Как видно из таблицы 3, различий между сравниваемыми группами по исходным клинико-функциональным характеристикам не было. Все пациенты (42 человека) получали ингаляционную терапию: антихолинэргические препараты длительного действия (ДДАХ) (тиотропия бромид ХандиХалер 18 мкг в сутки) в сочетании с комбинированными иГК (салметерол/флютиказона пропионат по 50/500 мкг 2 раза в день или формотерола фумарата дигидрат/будесонид по 9/320 мкг 2 раза в день). Пациенты в основной группе (25 человек) дополнительно получали рофлумиласт 500 мкг 1 раз/сут перорально.

Таблица 3

Исходная характеристика больных, включенных в исследование эффектов рофлумиласта ($M \pm SD$; Me[0,25p40,75p])

Показатели	Рофлумиласт + «тройная» терапия), n=25	«Тройная» терапия, n=17	p
Женщины / Мужчины	9/16	4/13	0,32
Возраст, лет	65,5 \pm 9,04	61,4 \pm 4,7	0,17
Индекс курения, пачка-лет	36,3 \pm 4,8	39,9 \pm 5,3	0,76
GOLD III / GOLD IV, число больных	15/10	12/5	0,48
Число обострений за предыдущий год на пациента	3 [2; 4]	2,5 [2; 4]	0,88

Включенные в исследование пациенты с обострением ХОБЛ в 44% случаев имели степень тяжести GOLD III, остальные – GOLD II и GOLD IV; частота

среднетяжелых или тяжелых обострений составляла от 1 до 5 в год (в среднем, $2,08 \pm 1,54$) (таблица 1).

Исходная характеристика 60 больных с обострением ХОБЛ без признаков острой дыхательной недостаточности, которые были включены в сравнительное исследование эффективности и безопасности небулизированного будесонида и преднизолона, представлена в таблице 4.

Таблица 4

Исходные характеристики групп больных с обострением ХОБЛ без признаков острой дыхательной недостаточности ($M \pm SD$)

Характеристики	Будесонид, 24 больных	Преднизолон, 36 больных	p
Женщины / Мужчины	7/17	14/22	0,11
Возраст, лет	$62,4 \pm 11,3$	$64,8 \pm 9,5$	0,76
Продолжают курить, % больных	66,7	58,3	0,51
Индекс курения, пачка-лет	$30,5 \pm 10$	38 ± 12	0,034
Длительность ХОБЛ, лет	18 ± 5	20 ± 6	0,12
Число обострений за предшествующий год на 1 пациента	$1,75 \pm 0,64$	$2,11 \pm 0,88$	0,044
GOLD II / GOLD III, число больных	14/10	19/17	0,67
<i>Сопутствующая патология, % больных:</i>			
- ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия	66,7	61,1	0,66
- сахарный диабет 2 типа, нарушение толерантности к глюкозе	16,7	13,9	0,77
<i>Терапия, % больных:</i>			
- β_2 -агонисты	83,3	77,8	0,6
- М-холинолитики	79,2	80,6	0,89
- комбинации иГК/ДДБА	29,2	41,7	0,33
- ксантины	50,0	58,3	0,53
- антибиотики	91,7	88,8	0,71
- муколитики	83,3	91,7	0,32

По гендерному составу, возрасту, длительности ХОБЛ, тяжести обструктивных нарушений и статусу курения сравниваемые группы были сопоставимы. Средний индекс курения в группе будесонида был ниже, чем во группе преднизолона, однако, у всех включенных в данное исследование больных

он превышал 20 пачка-лет. Среднее количество обострений в год на пациента в группе иГК оказалось ниже, чем в группе сГК, но различий по доле больных, имеющих 2 и более обострения в год, не было (41,7% в 1-й группе и 58,3% во 2-й группе; $p=0,21$). Помимо кортикостероидов, пациенты получали бронходилатирующую, антибактериальную, муколитическую терапию; различий между группами не было. Длительная кислородотерапия проводилась 16,6% больных группы будесонида и 22,2% больных группы системных кортикостероидов (различия частот не достоверны; $p=0,60$). Из сопутствующих заболеваний наиболее часто в обеих группах встречались артериальная гипертония, ишемическая болезнь сердца и сахарный диабет, по поводу которых проводилась соответствующая терапия.

Исходные характеристики 54 больных с обострением ХОБЛ, осложненным острой дыхательной недостаточностью, которые участвовали в исследовании эффективности и безопасности НВЛ в составе комплексной терапии и ее влияния на содержание растворимых форм мембранных молекул лейкоцитов, представлены в таблице 5.

Таблица 5

Исходная характеристика больных с обострением ХОБЛ, осложненным острой дыхательной недостаточностью ($M \pm SD$)

Показатели	НВЛ+стандартная терапия, n=30	Стандартная терапия, n=24	p
Женщины/Мужчины	13/17	10/14	0,91
Возраст, лет	60,5±11,1	64,1±10,5	0,21
Индекс курения, пачка-лет	31,4±14,5	36,5±8,3	0,13
GOLD III / GOLD IV, число больных	18/12	14/10	0,48
Число обострений за предыдущий год на пациента	2,33±1,23	2,13±0,64	0,45

По возрастно-половому составу, статусу и индексу курения, функциональным характеристикам, а также количеству обострений за предыдущий год сравниваемые группы больных были сопоставимы. Существенных различий по

применявшейся стандартной терапии по поводу обострения ХОБЛ между группами также не было.

2.3. Методы исследования

Методы обследования больных включали:

1. Клинические методы исследования: сбор жалоб и анамнеза заболевания, исследование объективного статуса с определением жизненно-важных параметров, оценка выраженности симптомов.
2. Рутинные (стандартные) лабораторные методы исследования: общий анализ крови, общий анализ мочи, общий анализ мокроты, биохимический анализ крови.
3. Инструментальные методы исследования: рентгенография (или компьютерная томография) органов грудной клетки, спирометрия, фибробронхоскопия, электрокардиография, эхокардиография.
4. Определение сывороточного уровня растворимых форм мембранных антигенов лейкоцитов.
5. Микробиологическое исследование отделяемого дыхательных путей.

Оценка клинических симптомов

Для оценки интенсивности курения подсчитывался индекс курящего человека (пачка-лет = количество сигарет, выкуриваемых в день x стаж курения в годах / 20) [131]. Для определения степени тяжести одышки использовался модифицированный вопросник Британского медицинского исследовательского совета (Modified British Medical Research Council (mMRC) questionnaire), результат оценивался в баллах от 0 до 4 [131, 248], также проводился подсчет частоты дыхательных движений. Выраженность симптомов определяли с помощью теста оценки влияния ХОБЛ (COPD Assessment Test – CAT) [131, 248]. Для определения выраженности кашля [1] и хрипов в легких использовали балльные шкалы (0 – отсутствие, 1 – легкая выраженность, 2 – умеренная выраженность, 3 – максимальная выраженность). При оценке исходов заболевания у госпитализированных больных улучшением считали уменьшение симптомов не

менее, чем на 1 балл от исходного уровня, уменьшение ЧДД до 18 – 20 в минуту, увеличение сатурации O_2 более 95%. Потребность в интенсификации терапии, вентиляционной поддержке или переводе в отделение реанимации расценивалось как ухудшение. Для определения *сатурации кислорода* (SpO_2) использовался портативный пульсоксиметр MD300 C1 (NIKSY, Китай).

Общий анализ крови

Забор крови на общий анализ проводился утром натощак. Параметры крови определяли с помощью автоматического гематологического анализатора 5-diff “Mythic 22AL” (Orphee, Швейцария). Кроме того, для дифференцировки клеток лейкоцитарного ряда производили микроскопию мазков крови, окрашенных по Романовскому. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) определяли микрометодом с использованием капилляра Панченкова, заполненного цитратом натрия и кровью пациента в соотношении 1:4.

Общий анализ мочи

Показатели общего анализа мочи исследовали методом «сухой химии» на анализаторе мочи Combilyzer (Human, Германия) с использованием тест-полосок «Combina-13» и проводили нативную микроскопию осадка патологической мочи.

Биохимический анализ крови

Основные показатели биохимического анализа (креатинин, мочеви́на, билирубин, печеночные трансаминазы, щелочная фосфатаза, мочевая кислота, общий белок, альбумин, электролиты) определяли натощак в сыворотке крови с использованием автоматического биохимического анализатора HumaStar 600 (Human, Германия). Уровень глюкозы определяли в капиллярной крови глюкозооксидазным методом на автоматическом анализаторе глюкозы Eco Twenty (CARE Diagnostica, Германия) натощак, после 12-14-часового голодания пациента. Качественное и полуколичественное определение содержания С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови осуществляли методом латекс-агглютинации с использованием набора реагентов «СРБ-ОЛЬВЕКС». Чувствительность определения составляет 6 мг/л.

Общий анализ мокроты

Сбор мокроты для исследования осуществляли утром натощак. Пациенты предварительно чистили зубы, язык, десны и полоскали рот кипяченой водой. Исследование мокроты включало изучение макроскопических характеристик (характера, цвета, прозрачности, запаха, консистенции, наличия примесей) и микроскопических характеристик (определение клеточных и других элементов). Микроскопическое исследование мокроты осуществлялась с использованием окрасок по Цилю-Нильсену, Граму, Романовскому.

Электрокардиография (ЭКГ) в 12-ти отведениях осуществлялась с использованием электрокардиографа "АКСИОН". *Эхо-доплер-кардиография* проводилась с использованием ультразвукового сканера SA-9900 CV. ЭКГ и эхокардиография проводились для исключения кардиальных причин одышки и другой респираторной симптоматики, а также для выявления гипертрофии правых отделов сердца.

Компьютерная томография была выполнена у 14,8% пациентов стабильной ХОБЛ и 22,2% пациентов с обострением ХОБЛ; остальным больным проводилась *рентгенография органов грудной клетки* в 2-х проекциях, при необходимости – томография и зонография с использованием цифрового комплекса рентгенодиагностического телеуправляемого «ОКО КРТ» научно-исследовательской производственной компании «Электрон» (Россия) для исключения других заболеваний легких и выявления признаков гиперинфляции.

Спирометрия

Исследование функции внешнего дыхания проводилось с использованием аппарата FlowScreen II (Jaeger, Германия) в соответствии со стандартами ATS – Американского торакального общества / Европейского респираторного общества (ATS/ERS) [276]. Для исследования обратимости обструкции использовали пробу с ингаляционными бронходилататорами и оценивали их влияние на показатель ОФВ₁. Предварительно были отменены β 2-агонисты короткого действия – за 6 часов до начала теста, β 2-агонисты длительного действия – за 12 часов,

продолжительные теофиллины – за 24 часа. В качестве бронходилатационного препарата при проведении теста применяли ингаляционный сальбутамол в дозе 400 мкг. При приросте $ОФВ_1$ на 12% и более по отношению к исходному уровню и на 200 мл бронхиальную обструкцию расценивали как обратимую [131].

Оценивались постбронходилатационные показатели: жизненная емкость легких (ЖЕЛ); форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ); $ОФВ_1$; модифицированный индекс Тиффно (отношение $ОФВ_1/ФЖЕЛ$); максимальная объемная скорость выдоха на уровне 25%, 50% и 75% ФЖЕЛ (МОС25, МОС50 и МОС75), отражающая проходимость на уровне крупных, средних и мелких бронхов; средняя объемная скорость середины выдоха между 25% и 75% ФЖЕЛ (СОС25-75); пиковая объемная скорость выдоха (ПОС). Должные величины рассчитывались автоматически с учетом пола, возраста и роста каждого пациента [98].

Бронхоальвеолярный лаваж

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) был выполнен у 31 (21,7%) пациента ХОБЛ при фибробронхоскопии, проводимой под местной анестезией в положении больного сидя, после визуального обследования трахеи и бронхов. Использовали видеобронхоскоп OLYMPUS BF-1T150. Промывную жидкость (стерильный изотонический раствор хлорида натрия с рН 7,2-7,4 и температурой 38-40°C) вводили в устье сегментарного или субсегментарного бронха с помощью шприца порциями по 20 мл с последующей ее вакуум-аспирацией в стерильную емкость.

Мазки со слизистых оболочек носа и зева

В течение 24 часов до взятия мазков исключалось использование спреев, растворов для полоскания горла, назальных мазей или капель, содержащих кортикостероиды, противомикробные средства, антибиотики. Забор материала осуществляли утром, до приема пищи и чистки зубов. Для получения мазка со слизистой зева просили больного широко открыть рот. Фиксируя язык шпателем, проводили стерильным тампоном на конце пластиковой палочки по слизистой миндалин, небных дужек, язычка, и задней стенки глотки. Для взятия мазков из

носа приподнимали кончик носа пациента и легким вращательным движением вводили стерильный тампон сначала в один, затем в другой нижний носовой ход.

*Микробиологическое исследование отделяемого
со слизистых дыхательных путей*

Исследовали бронхоальвеолярную жидкость, а также свободно откашливаемую мокроту, полученную утром натощак. Мокроту или БАЛ собирали в стерильную посуду с завинчивающейся крышкой, срок доставки материала в лабораторию не превышал 2 часов от момента ее получения. Посев мокроты проводился при наличии в мазке более 25 полиморфноядерных лейкоцитов и менее 10 эпителиальных клеток (для исключения риска контаминации образца слюной). Наряду с забором мокроты/БАЛ у больных были взяты мазки со слизистых оболочек носа и зева для исследования микрофлоры ВДП. Отбор и транспортировку биоматериала проводили в соответствии с МУ 4.2.2039-05 [126].

Выделение и идентификацию бактерий осуществляли согласно Приложению к приказу №535 МЗ СССР от 22 апреля 1985 года с модификацией количественного определения бактерий по методу секторных посевов [85] и по методическим рекомендациям [27]. Посев материала осуществляли на следующие среды: триптико- соевый агар («БиоМерье», Франция) с добавлением 5% эритроцитарной массы человека и 10% лошадиной сыворотки, среду Эндо, желточно-солевой агар, среду Сабуро.

Всего из отделяемого бронхов было выделено 269 культур микроорганизмов, со слизистой зева – 232 культуры и со слизистой носа – 74 культуры, проведена их идентификация до рода и у 166 культур – до вида с использованием систем индикаторных бумажных для идентификации бактерий (НПО «Микроген») и СТРЕПТОтеста 16 («ЛАХЕМА», Чехия).

Чтобы исключить возможную контаминацию мокроты микрофлорой носо- и ротоглотки при оценке микробного пейзажа нижних дыхательных путей учитывались изоляты стрептококков, стоматokokков, коринебактерий, гемофильных палочек, нейссерий и моракселл, выделенные из мокроты в

количестве 10^6 КОЕ/мл и выше; стафилококков, энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий – в количестве более 10^2 КОЕ/мл; кандид – более 500 КОЕ/мл, при условии стократного преобладания возбудителей в мокроте по сравнению со слизистой зева [16, 73, 177]. При исследовании БАЛ диагностически значимыми считали изоляты бактерий в количестве более 10^2 КОЕ/мл.

У идентифицированных культур проверялась чувствительность к антибиотикам групп пенициллина, цефалоспоринов, макролидов, фторхинолонов, аминогликозидов, линкозамидов, тетрациклина, хлорамфеникола и карбапенемов диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона по МУК 4.2.1890-04 [91]. Чувствительность пневмококков к пенициллиновому ряду антибиотиков проводили с использованием дисков, содержащих 1 мкг оксациллина [30]. Культуры грибов рода *Candida* (43 – из мокроты, 29 – со слизистой зева) проверялись на чувствительность к противогрибковым препаратам (нистатину, амфотерицину В, клотримазолу) диско-диффузионным методом на среде Сабуро.

У выделенных условно-патогенных бактерий были исследованы факторы патогенности и персистенции. Адгезивные свойства бактерий изучались методом гемагглютинации [94] и по образованию биопленок. Изучение способности к пленкообразованию проводилось при исследовании адгезии микроорганизмов к полистеролу в плоскодонных пластиковых планшетах, с окраской полученной биопленки кристалвиолетом [82, 132]. Для количественной оценки использовали степень абсорбции красителя этанолом, измеренную при длине волны 630 нм и выраженную в единицах оптической плотности (ед. ОП). Способность к формированию биопленки считалась низкой при уровне ОП $<0,5$ ед., средней – при уровне $0,5 - 1,0$ ед. ОП, высокой – при $>1,0$ ед. ОП. Инвазивные способности бактерий изучались по лизоцимной активности чашечным методом [56] и протеолитической активности [40]. Качественную оценку протеолитической активности (ПА) осуществляли по гидролизу казеина. При количественном определении ПА у бактерий оценивали наличие кислых и щелочных внеклеточных

протеиназ по гидролизу двух субстратов – гемоглобина в кислой среде (рН 4,0) и казеина при щелочных значениях рН 8,0; результаты выражали в единицах активности (е.а./мл). Факторы персистенции бактерий изучались по проявлениям антилизоцимной, антилактоферриновой, антииммуноглобулиновой активности. АЛА микроорганизмов определяли фотометрическим методом, оценивая остаточную активность после инкубации супернатанта исследуемой культуры и раствора лизоцима в отношении тест-культуры *Micrococcus luteus*; выражали в мкг/мл*ед.ОП [70]. АЛФА исследовали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа, определяя остаточное количество лактоферрина в инкубационной смеси; выражали в абсолютных величинах инактивированного бактериями лактоферрина (нг/мл) [84]. АИГА изучали методом радиальной иммунодиффузии в агаре [77] и твердофазным иммуноферментным методом [120], оценивая концентрацию остаточного иммуноглобулина; результаты выражали в %.

*Исследование сывороточного уровня растворимых форм
дифференцировочных молекул клеток иммунной системы*

Определение содержания растворимых форм мембранных молекул в сыворотке крови проводилось двухсайтовым иммуноферментным методом с применением моноклональных антител (МКА) и поликлональных антител, специфичных к мембранным антигенам мононуклеарных клеток крови человека. Были использованы МКА серии ИКО, полученные в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН.

Сывороточные концентрации растворимых форм антигенов CD50, CD25, CD8, CD16 и суммарных фракций молекул CD54, CD95 и CD38 исследовали с помощью меченых пероксидазой корня хрена МКА ИКО-60, ИКО-105, ИКО-31, ИКО-116, ИКО-184, ИКО-160 и ИКО-20, соответственно, а также поликлональных антител против антигенов мононуклеаров периферической крови человека, которые сорбировались в лунки планшетов для иммуноферментного анализа и использовались в качестве «подложки» [122]. При определении уровня олигомерных фракций антигенов sCD54, sCD95 и sCD38 в качестве «первичных»

антител применялись очищенные МКА ИКО-184, ИКО-160 и ИКО-20, соответственно, а в качестве «вторичных» антител – МКА ИКО-184, ИКО-160 и ИКО-20, конъюгированные с пероксидазой хрена [120, 121]. При исследовании уровня растворимых молекул главного комплекса гистосовместимости I класса использовались МКА ИКО-53, направленные против тяжелой цепи молекул HLA-I, и меченные пероксидазой хрена МКА ИКО-216 против β_2 -микроглобулина. Содержание растворимых молекул HLA-DR определяли с использованием меченных пероксидазой хрена МКА ИКО-1 [53].

Оптическая плотность раствора окрашенного продукта измерялась при длине волны 450 и 630 нм с использованием планшетного спектрофотометра для иммуноферментного анализа СТАТ-ФАКС-2100. Полученные данные выражали в условных единицах (усл.ед./мл). Образцы сыворотки крови больных сопоставлялись с результатами обследования контрольной группы, в которую вошли 40 здоровых некурящих доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными пациентами.

2.4. Статистическая обработка результатов

Результаты исследований заносились в электронные таблицы «Microsoft Excel 2013». Статистический анализ производился с помощью программ «Statistica 10» и «Minitab 16». Характер распределения данных оценивался с использованием критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилкса. В случае распределения близкого к нормальному, результаты представлялись в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – среднее квадратическое отклонение, для анализа использовались параметрические критерии. При распределении признака, отличном от нормального, данные представлялись в виде медианы и перцентилей $Me[25p;75p]$, анализ данных проводился с помощью непараметрических методов. Из параметрических методов использовались t-критерий Стьюдента для независимых и зависимых выборок. Из методов непараметрической статистики использовались критерий Манна-Уитни и парный критерий Вилкоксона. При сравнении нескольких групп в случае нормального распределения проводился

однофакторный дисперсионный анализ (ОДА) с определением критерия Фишера (F) для сравнения дисперсий; при распределении, отличном от нормального – дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Результаты представлялись в виде $M \pm 0,95 \text{ Conf. Interval}$, где Conf. Interval – доверительный интервал; $M \pm SE$, где SE – стандартная ошибка среднего. Для сравнения частот в независимых выборках использовался критерий хи-квадрат χ^2 . Анализ корреляционных взаимоотношений между исследуемыми показателями осуществлялся с помощью критерия ранговой корреляции Спирмена (r) с визуальным контролем диаграмм рассеяния и исключением выбросов. Для оценки аналитической зависимости между переменными величинами использовался метод простого регрессионного анализа. С целью формирования относительно однородных групп из совокупности пациентов, обследованных по ряду признаков, в некоторых случаях выполнялся кластерный анализ. Кластеризация проводилась методом k-средних. За уровень статистической значимости принималась величина $p < 0,05$. При $0,05 \leq p < 0,1$ выносилось суждение о наличии статистической тенденции [109].

ГЛАВА 3. КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ И СОСТОЯНИЕ МАРКЕРОВ ИММУНИТЕТА

3.1. Содержание растворимых дифференцировочных антигенов лейкоцитов и молекул гистосовместимости в зависимости от степени тяжести, фенотипа и частоты обострений хронической обструктивной болезни легких

На первом этапе были изучены особенности клинических проявлений ХОБЛ и состояние биомаркеров иммунитета при разных степенях бронхиальной обструкции (таблицы 6 и 7). Для начальной стадии был характерен более молодой состав больных. Прогрессирование ХОБЛ было ассоциировано с увеличением индекса курения, хотя по длительности заболевания достоверных различий не было. Нарастание тяжести функциональных нарушений сопровождалось увеличением числа обострений, усилением не только одышки, но и других респираторных симптомов, включая кашель и продукцию мокроты, что привело к возрастанию балла оценочного теста ХОБЛ. На связь хронических респираторных симптомов со снижением функции внешнего дыхания указывают и другие авторы [89]. В последнюю редакцию GOLD (2016 года) включены результаты исследований, показавших, что кашель с мокротой ассоциирован еще и с повышением смертности на ранних стадиях ХОБЛ [202, 248]. Однако достоверных различий по количеству лейкоцитов мокроты и общей микробной нагрузке у больных разной тяжести нами не было выявлено, что, видимо, объясняется стабильной фазой заболевания. Вместе с тем при прогрессировании ХОБЛ отмечалось увеличение числа видов микроорганизмов, высеваемых из НДП. Если практически у всех больных GOLD I выделялись монокультуры, то для больных с $ОФВ_1 < 50\%$ должно были характерны микробные ассоциации, которые у 75% пациентов GOLD IV включали не менее 5 видов микроорганизмов.

Клинико-функциональная и лабораторная характеристика больных ХОБЛ разной степени тяжести (M±SD; Me[0,25p;0,75p])

Показатель	GOLD I (n=13)	GOLD II (n=15)	GOLD III (n=38)	GOLD IV (n=26)	p ода
<i>Клинические показатели</i>					
Возраст, лет	56±16	64±9	64±8	60±9	0,043
Длительность заболевания, лет	13±10	16±9	21±15	25±17	0,19
Индекс курения, пачка-лет	7[7;35]	20[10;35]	40[36;40]	40[40;45]	0,002
Число обострений на пациента в год	0,9±0,3	1,1±0,3	2,0±1,0	3,5±1,0	<0,001
САТ, балл	9,5±3,5	13,2±6,4	20,8±8,1	23,5±6,1	0,03
mMRC, балл	0,8±0,6	2,0±0,8	2,0±1,0	3,0±0,9	<0,001
<i>Функциональные показатели (% должного)</i>					
ОФВ ₁	94[83;119]	65[63;77]	38[32;45]	29[19;29]	<0,001
ЖЕЛ	92[84;115]	72[63;82]	66[56;76]	60[55;67]	<0,001
ФЖЕЛ	86[77;99]	62[58;86]	39[38;47]	29[20;37]	<0,001
МОС ₂₅	148[109;150]	46[35;50]	40[33;62]	26[21;30]	0,056
МОС ₅₀	54[49;97]	28[25;40]	12[9;16]	10[6;12]	<0,001
МОС ₇₅	69[60;85]	31[27;53]	12[9;19]	11[7;15]	<0,001
<i>Лабораторные показатели</i>					
Лейкоциты крови, x10 ⁹ /л	7,8±2,8	10,1±3,8	9,8±3,9	10,5±3,5	0,52
Нейтрофилы мокроты, клеток в поле зрения	7 [2;40]	19 [7;80]	38 [12;100]	23 [17;40]	0,45
Количество видов микробов	1[1;1]	3[1;4]	3[3;4]	5[4;5]	0,029
Бактериальная обсемененность, lg КОЕ/мл	6 [4;7]	7 [7;8]	9 [8;9]	8 [7;8]	0,19

Изучение биомаркеров состояния иммунитета позволило обнаружить низкие средние значения 9 из 13 растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов у всех обследованных больных ХОБЛ, причем прогрессирование заболевания сопровождалось усугублением выявленных нарушений (таблица 7).

Содержание растворимых форм дифференцировочных лейкоцитарных антигенов и молекул гистосовместимости у больных ХОБЛ разной степени тяжести (Me[0,25p;0,75p])

Показатель (усл.ед./мл)	Доноры (n=40)	ХОБЛ (n=92)	GOLD I (n=13)	GOLD II (n=15)	GOLDIII (n=38)	GOLD IV (n=26)
sCD95 суммарный	377 [359;394]	264[195; 389]**	317 [235;394]	286 [199;544]	279[164; 398]**	240 [189; 333]**
sCD95 димер	250 [238;260]	167 [90; 246]**	132 [75; 182]**	204 [88;274]	208 [95; 270]*	108 [90; 247]*
sCD54 суммарный	63 [58;69]	50 [23; 75]**	56 [36;76]	55 [15;76]	52 [27;66]*	34 [23; 64]**
sCD54 димер	151 [142;184]	99 [34; 149]**	77 [34; 110]**	71 [26;213]*	107 [53; 152]**	106 [29; 174]**
sCD8	376 [358;385]	311[103; 447]	329 [158;425]	352 [257;461]	325[143; 502]	103 [60; 435]*
sCD38 суммарный	197 [173;212]	126 [68; 222]**	189 [98;197]	210 [130;260]	106 [81; 173]**	85 [39; 216]**
sCD38 димер	256 [238;269]	129 [56; 280]**	114 [63; 159]**	129 [57;292]*	168 [60;315]	93 [54; 263]**
sCD25	398 [380;420]	333[182; 464]*	369 [241;401]	376 [233;481]	372[177; 578]	192[148; 406]**
sCD50	354 [339;368]	273[161; 345]**	287 [152; 298]**	309 [265; 347]*	268[171; 378]*	181[151; 321]**
sHLA-I	991[949; 1089]	705[372; 1356]**	699 [290; 856]**	768 [606; 1129]*	838[372; 1554]	463[378; 1591]*
sHLA-DR	98 [89;104]	83 [33;127]	84 [42;98]	102 [79;128]	82 [36;193]	49[28; 121]*
sCD16	129 [98;140]	106 [48;218]	54 [48;91]	48 [45;115]	89 [55;229]	54 [48;97]
sCD14	118 [87;137]	101 [68;147]	97 [86;104]	109 [92;109]	104 [90;173]	95 [77;137]

Примечание: * p<0,05 при сравнении с донорами; ** p<0,01 при сравнении с донорами

При I и II степени тяжести среднее содержание 8-9 из 13 исследованных иммунных маркеров находилось в пределах нормальных значений; был умеренно понижен лишь уровень молекул sCD50, sHLA-I и димерных фракций sCD38, sCD54

sCD95 (последних – только при GOLD I). В то же время при III степени тяжести отмечено снижение 6 тестируемых показателей на 17-46%, а при IV степени – уменьшение средних концентраций 11 антигенов на 30-73% от уровня донорских значений. Однако различий содержания исследованных молекул между больными с разной степенью бронхиальной обструкции не было, за исключением содержания растворимых форм активационного маркера CD25 при GOLD IV, которое было снижено по сравнению с остальными степенями тяжести ХОБЛ ($p < 0,05$ для всех), и отмеченной также при GOLD IV тенденции к уменьшению уровня суммарных антигенов sCD38 по сравнению с GOLD II ($p = 0,058$) и молекул sCD8 по сравнению с GOLD III ($p = 0,057$). В связи с этим требовалось изучение других факторов, влияющих на профиль иммунных биомаркеров при ХОБЛ.

Было изучено влияние фенотипа БА-ХОБЛ на клинико-функциональные характеристики и уровень растворимых форм мембранных молекул клеток иммунной системы. Демографические и основные клинические характеристики пациентов с сочетанием БА-ХОБЛ (25 пациентов) и «изолированной» ХОБЛ (67 пациентов) представлены в таблицах 8 и 9. При БА-ХОБЛ отмечены тенденции к увеличению числа больных женского пола и меньшей интенсивности курения по сравнению с ХОБЛ без сопутствующей БА, что является характерным для перекрест-синдрома и по мнению других исследователей [128]. Вместе с тем, влияние табачного дыма имело значение как при ХОБЛ без БА, так и при сочетании БА и ХОБЛ, так как все включенные больные были настоящими или бывшими курильщиками, и индекс курения более 20 пачка-лет наблюдался у 64% больных БА-ХОБЛ и 76% больных «изолированной» ХОБЛ ($p = 0,25$). Количество больных со степенью тяжести GOLD III в группе ХОБЛ было выше, чем при БА-ХОБЛ (таблица 8), однако доли больных с $ОФВ_1 < 50\%$ должного в группах не различались (соответственно 74,6% и 60% больных; $p = 0,17$). Различий по основным показателям ограничения скорости воздушного потока, включая $ОФВ_1$, ФЖЕЛ и индекс Тиффно, в сравниваемых группах не было, хотя у больных БА-ХОБЛ был отмечен более низкий уровень МОС25, а у пациентов «изолированной» ХОБЛ – МОС50. Таким образом, по демографическим данным, длительности заболевания,

статусу курения, частоте обострений и тяжести бронхиальной обструкции пациенты с «изолированной» ХОБЛ и перекрест-синдромом БА-ХОБЛ были сопоставимы.

Таблица 8

Демографические и клинические характеристики больных при «изолированной» ХОБЛ и перекрест-синдромом БА-ХОБЛ (M±SD; Me[0,25p;0,75p]; количество (%) больных)

Показатель	ХОБЛ (n=67)	БА-ХОБЛ (n=25)	p
Возраст, лет	61±11	64±8	0,22
Женщины, число (%)	12 (18)	9 (36)	0,097
Длительность заболевания, лет	14[5;30]	16[14;20]	0,51
Индекс курения, пачка-лет	39±17	30±12	0,062
<i>Степень тяжести бронхообструктивных нарушений</i>			
GOLD I - II	15 (44,3)	10 (40,0)	0,75
GOLD III	33 (49,3)	6 (24,0)	0,029
GOLD IV	17 (25,4)	9 (36,0)	0,32
Число обострений в год	2[1;3]	2[1;4]	0,65

Балл оценочного САТ-теста и выраженность одышки у больных БА-ХОБЛ отличались более высокими значениями, уровень гемоглобина был выше при «изолированной» ХОБЛ (таблица 9). Большая выраженность клинических симптомов при перекрест-синдроме обусловлена отягчающим влиянием сопутствующей бронхиальной астмы [128, 186]. Вторичный эритроцитоз, как известно, является следствием гипоксемии и нарушения вентиляционно-перфузионных отношений, в формировании которых ключевую роль играют длительно существующая фиксированная бронхиальная обструкция и эмфизематозная деструкция легочного капиллярного русла, типичные именно для ХОБЛ [271]. В группах с разными фенотипическими характеристиками было исследовано содержание растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов. Поскольку при разных фенотипах «изолированной» ХОБЛ (бронхитическом, эмфизематозном и эмфизематозно-бронхитическом) концентрации растворимых дифференцировочных молекул лейкоцитов достоверно не различались между собой ($p_{\text{рода}} > 0,08$ для всех исследуемых антигенов), эти больные были объединены в одну группу.

Симптомы, лабораторные и функциональные показатели при «изолированной» ХОБЛ и перекрест-синдроме БА-ХОБЛ ($M \pm SD$; $Me[0,25p;0,75p]$)

Показатель	ХОБЛ (n=67)	БА-ХОБЛ (n=25)	p
<i>Симптомы</i>			
САТ-тест, баллы	19±7	27±5	0,005
mMRC, баллы	2±1	3±1	<0,001
<i>Лабораторные показатели</i>			
Нейтрофилы мокроты, клеток в поле зрения	25[5;60]	12[8;25]	0,62
Количество видов микроорганизмов в мокроте	3±1	3±2	0,61
Бактериальная обсемененность, lg КОЕ/мл	7[7;8]	8[7;8]	0,94
Лейкоциты крови, $\times 10^3/\text{л}$	9±3	9±2	0,44
Гемоглобин, г/л	155[148;175]	143[125;152]	0,022
СОЭ, мм/ч	8[5;18]	12[10;17]	0,31
<i>Показатели ФВД</i>			
ОФВ ₁ , % должного	44[28;55]	47[31;78]	0,38
ЖЕЛ, % должного	66[58;77]	71[61;84]	0,39
ФЖЕЛ, % должного	55[39;78]	65[32;70]	0,35
Модифицированный индекс Тиффно, %	50[42;64]	48[44;59]	0,92
ПОС, % должного	34[27;50]	38[26;49]	0,89
МОС25, % должного	43[33;62]	22[12;34]	0,007
МОС50, % должного	12[8;24]	19[15;34]	0,039
МОС75, % должного	11[7;22]	15[11;36]	0,45

Для оценки влияния фенотипа БА-ХОБЛ на биомаркеры был проведен сравнительный анализ в группах больных «изолированной» ХОБЛ, БА-ХОБЛ и в контрольной группе здоровых доноров (таблица 10). У больных «изолированной» ХОБЛ были снижены по сравнению с донорами средние уровни 12 из 13 растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов, а у больных БА-ХОБЛ – только значения суммарного антигена sCD95, молекул sHLA-I и антигена sCD16. При этом уровни антигенов sCD38 суммарного и sCD50 у больных ХОБЛ отличались более низкими значениями по сравнению с фенотипом БА-ХОБЛ;

различия в содержании растворимого димера CD54 и суммарного CD95 антигена находились в пределах статистической тенденции.

Таблица 10

Содержание растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов и молекул гистосовместимости у больных «изолированной» ХОБЛ, БА-ХОБЛ и в контрольной группе доноров (Me[0,25p;0,75p])

Показатель, усл.ед./мл	Доноры (n=40)	ХОБЛ (n=67)	БА-ХОБЛ (n=25)	p ХОБЛ – БА-ХОБЛ
sCD95 суммарный	377[359;394]	239[174;360]**	333[241;518]	0,067
sCD95 димер	250[238;260]	179[88;245]*	155[96;247]**	0,45
sCD54 суммарный	63[58;69]	41[23;66]**	55[28;89]	0,1
sCD54 димер	151[142;184]	77[34;135]**	113[77;224]	0,07
sCD8	376[358;385]	269[106;420]*	350[109;654]	0,11
sCD38 суммарный	197[173;212]	104[54;197]**	192[108;260]	0,007
sCD38 димер	256[238;269]	115[57;244]**	176[50;359]	0,51
sCD25	398[380;420]	262[177;446]**	375[194;562]	0,47
sCD50	354[339;368]	223[152;321]**	300[194;381]	0,002
sHLA-I	991[949;1089]	675[306;1423]*	774[430;1027]*	0,25
sHLA-DR	98[89;104]	80[31;121]*	104[42;161]	0,16
sCD16	129[98;140]	59[48;166]*	53[49;54]*	0,24
sCD14	118[87;137]	101[90;137]	97[82;258]	0,9

Примечание: *p<0,05 по сравнению с донорами; **p<0,01 по сравнению с донорами

Особенности содержания растворимых дифференцировочных молекул у больных «изолированной» ХОБЛ и фенотипом БА-ХОБЛ были изучены с учетом степени бронхиальной обструкции. При «изолированной» ХОБЛ уровень большинства исследованных антигенов при любых значениях ОФВ₁ был снижен по сравнению с донорами, и однофакторный дисперсионный анализ не выявил различий в их содержании между больными ХОБЛ I-IV степени тяжести. Однако при объединении сравниваемых подгрупп были обнаружены различия между пациентами «изолированной» ХОБЛ I-II и III-IV степени тяжести (таблица 11).

Таблица 11

Содержание растворимых дифференцировочных молекул в сыворотке больных «изолированной» ХОБЛ и БА-ХОБЛ при разной степени бронхообструктивных нарушений (Me[0,25p;0,75p])

Показатель, усл.ед./мл	Доноры (n=40)	ХОБЛ			БА-ХОБЛ		
		ОФВ ₁ ≥50% должного (1)	ОФВ ₁ <50% должного (2)	p 1-2	ОФВ ₁ ≥50% должного (1)	ОФВ ₁ <50% должного (2)	p 1-2
		(n=17)	(n=50)		(n=10)	(n=15)	
sCD95 суммар.	377[359;394]	294[216;360]*	225[169;360]*	0,65	452[259;580]*	257[190;449]	0,22
sCD95 димер	250[238;260]	96[79;185]*	197[90;258]*	0,11	210[132;239]	108[93;277]*	0,58
sCD54 суммар.	63[58;69]	42[19;73]*	39[24;64]*	0,78	66[55;190]	51[24;83]	0,31
sCD54 димер	151[142;184]	39[25;107]*	102[38;149]*	0,008	143[92;224]#	109[54;218]	0,58
sCD8	376[358;385]	254[125;416]*	279[103;427]	0,96	413[329;654]#	193[68;706]	0,23
sCD38 суммар.	197[173;212]	167[73;210]*	94[52;166]*	0,31	230[191;286]#	168[67;221]*	0,049
sCD38 димер	256[238;269]	96[54;130]*	145[59;296]*	0,033	206[154;323]#	87[46;369]	0,62
sCD25	398[380;420]	309[219;400]	253[163;482]*	0,74	440[373;562]*#	260[141;501]	0,049
sCD50	354[339;368]	278[149;301]*	211[159;334]*	0,72	317[298;671]#	246[162;386]	0,25
sHLA-I	991[949;1089]	594[290;746]*	705[359;1603]*	0,08	1095[820;1972]*#	447[398;888]*	0,013
sHLA-DR	98[89;104]	86[29;102]*	58[31;126]	0,87	111[81;161]	98[31;183]	0,58
sCD16	129[98;140]	51[46;58]*	80[50;167]	0,09	56[47;60]	51[49;54]	0,76
sCD14	118[87;137]	100[89;109]	101[90;158]	0,69	100[77;258]	97[82;158]	0,68

Примечание: суммар. – суммарный; *p<0,05 по сравнению с контрольной группой доноров; #p<0,05 при межгрупповом сравнении (БА-ХОБЛ vs «изолированная» ХОБЛ аналогичной тяжести)

У больных ХОБЛ с $ОФВ_1 < 50\%$ должной величины при сравнении с I-II степенью тяжести отмечены более высокие средние значения димеров sCD54 и sCD38 и тенденция к увеличению концентраций молекул sCD16 и sHLA-I, что может быть обусловлено усилением воспаления и клеточной активации у части больных с тяжелым течением ХОБЛ.

Для перекрест-синдрома был характерен другой профиль растворимых дифференцировочных молекул лейкоцитов. При умеренной степени тяжести уровни антигенов sCD95 суммарного, sCD25 и sHLA-I оказались на 10-20% выше донорских значений, концентрации других молекул не отличались от контрольного уровня. При тяжелой/крайне тяжелой степени бронхообструктивных нарушений содержание суммарного димера sCD95, молекул sCD38, sCD25 и sHLA-I уменьшилось по сравнению с донорами, а уровень трех последних молекул – также по сравнению с БА-ХОБЛ I-II степени тяжести (таблица 11). Межгрупповой анализ показал, что различия между фенотипом БА-ХОБЛ и «изолированной» ХОБЛ выявлялись только при умеренной тяжести бронхиальной обструкции. При $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного у больных с перекрест-синдромом наблюдалось увеличение содержания молекул sCD25 и sHLA-I по сравнению как с донорами, так и с «изолированной» ХОБЛ, а также повышение уровней димера sCD54, молекул sCD50, антигенов sCD8 и sCD38 (суммарного и димера) и тенденция к повышению ($p=0,09$) суммарных и олигомерных фракций sCD95, молекул sHLA-DR по сравнению с «изолированной» ХОБЛ (таблица 11). При $ОФВ_1 < 50\%$ должного только концентрации sCD16, дифференцировочных молекул натуральных киллеров, проявляли тенденцию к более высоким значениям у больных ХОБЛ по сравнению с БА-ХОБЛ ($p=0,056$), в остальном различий между группами больных не было, т.е. высокая степень тяжести заболевания нивелировала влияние фенотипа с сопутствующей астмой на содержание иммунных маркеров.

Были изучены особенности течения заболевания и состояние иммунного ответа при фенотипе с частыми обострениями. Клинико-функциональные характеристики больных в зависимости от частоты обострений представлены в таблице 12.

Клинико-функциональные характеристики больных с частыми и редкими обострениями ($M \pm SD$; $Me[0,25p;0,75p]$)

Показатель	Частые обострения (n=63)	Редкие обострения (n=29)	p
Возраст	64[60;65]	61[53;70]	0,25
Длительность заболевания	20[9;38]	13[10;20]	0,048
Длительность курения	36[25;41]	18[7;35]	0,03
Индекс курения	40[20;45]	20[10;37]	<0,001
Число обострений	2[1;4]	1[1;1]	<0,001
САТ-тест, баллы	21±7	10±3	0,002
mMRC, баллы	3[2;3]	1[1;2]	<0,001
Нейтрофилы мокроты, клеток в поле зрения	20[14;40]	12[5;60]	0,53
Количество видов микроорганизмов в мокроте	4±1	2±1	0,13
Бактериальная обсемененность, lg КОЕ/мл	8[7;9]	7[7;7]	0,09
Лейкоциты крови, $\times 10^3/\text{л}$	9±3	9±3	0,33
Гемоглобин, г/л	149[124;174]	153[140;160]	0,84
СОЭ, мм/ч	11[5;22]	12[8;22]	0,69
ОФВ ₁ , % должного	34[25;41]	78[64;93]	<0,001
Модифицированный индекс Тиффно, %	46[42;59]	66[59;67]	<0,001
ЖЕЛ, % должного	71[55;73]	84[66;92]	<0,001
ФЖЕЛ, % должного	40[35;47]	75[58;92]	0,01
ПОС, % должного	27[26;34]	46[36;67]	0,19
МОС25, % должного	40[26;62]	61[34;71]	0,7
МОС50, % должного	11[7;14]	45[28;54]	<0,001
МОС75, % должного	11[7;15]	46[33;118]	<0,001

Частые обострения у больных ХОБЛ были ассоциированы с более длительным анамнезом заболевания, большим стажем и интенсивностью курения, выраженностью одышки и других симптомов, значительными функциональными нарушениями; также отмечалась тенденция к увеличению бактериальной обсемененности мокроты по сравнению с редкими обострениями. Содержание

растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток в сыворотке больных с разной частотой обострений представлены в таблице 13.

Таблица 13

Содержание растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов у больных с частыми и редкими обострениями и в контрольной группе доноров (Me[0,25p;0,75p])

Показатель, усл.ед./мл	Доноры (n=40)	Частые обострения (n=63)	Редкие обострения (n=29)	p редкие – частые обострения
sCD95 суммарный	377[359;394]	248[174;368]*	316[234;458]	0,048
sCD95 димер	250[238;260]	147[90;269]*	179[89;217]*	0,57
sCD54 суммарный	63[58;69]	38[24;65]*	55[22;76]	0,47
sCD54 димер	151[142;184]	104[35;152]*	84[30;144]*	0,25
sCD8	376[358;385]	279[90;466]*	340[156;437]	0,41
sCD38 суммарный	197[173;212]	99[56;173]*	191[126;264]	0,005
sCD38 димер	256[238;269]	122[55;306]*	121[58;221]*	0,54
sCD25	398[380;420]	253[158;467]*	386[225;471]	0,16
sCD50	354[339;368]	210[159;367]*	288[165;325]*	0,61
sHLA-I	991[949;1089]	612[378;1590]#	758[336;994]*	0,85
sHLA-DR	98[89;104]	58[31;129]#	93[60;126]	0,54
sCD16	129[98;140]	58[50;135]#	54[48;60]*	0,36
sCD14	118[87;137]	100[87;157]	102[89;109]	0,76

*p<0,01 по сравнению с донорами; #p<0,05 по сравнению с донорами

Концентрации димеров sCD95, sCD54, sCD38, антигенов sCD50 и sCD16, молекул HLA-I были ниже донорских значений независимо от частоты обострений. При частых обострениях наблюдалось также уменьшение уровней молекул гистосовместимости II класса и sCD25, маркеров цитотоксических лимфоцитов CD8, суммарных фракций антигенов sCD54, sCD95, sCD38, в среднем, на 26-50% ниже нормы; при этом содержание двух последних антигенов достоверно отличалось как по сравнению с донорами, так и с больными, у которых обострения были редкими.

Влияние частоты обострений на содержание иммунных маркеров также было исследовано у больных с фенотипами БА-ХОБЛ и «изолированной» ХОБЛ (рисунок 3). Для больных «изолированной» ХОБЛ с частыми обострениями было

характерно более высокое содержание олигомерных фракций молекул адгезии sCD54 ($p=0,021$), отражающее рекрутирование клеток воспаления в легочную ткань, и низкий уровень маркера клеточной активации sCD38 ($p<0,01$) по сравнению с редкими обострениями. У больных БА-ХОБЛ при частых обострениях также было уменьшено содержание sCD38 ($p<0,01$); наряду с этим выявлено снижение концентраций растворимых рецепторов IL-2 ($p=0,047$) и молекул гистосовместимости I класса ($p=0,016$). Обнаруженные изменения свидетельствуют о том, что угнетение процессов активации иммунокомпетентных клеток ассоциировано с увеличением частоты обострений как при «изолированной» ХОБЛ, так и при сочетании ее с бронхиальной астмой.

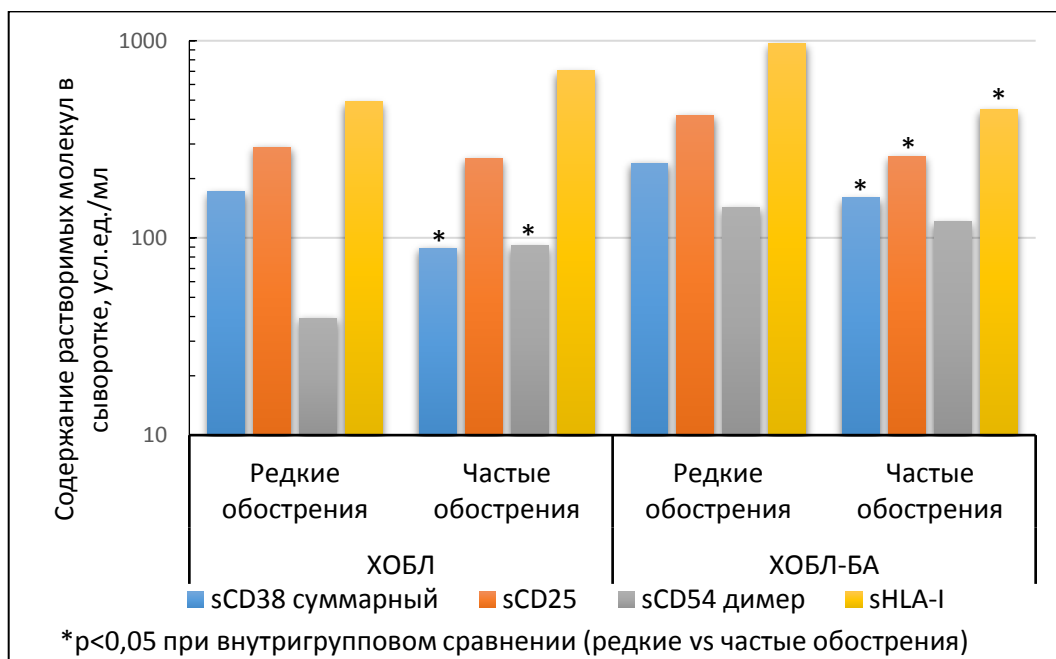


Рисунок 3. Содержание антигенов sCD38, sCD25, димера sCD54 и молекул гистосовместимости I класса в сыворотке больных «изолированной» ХОБЛ и БА–ХОБЛ с разной частотой обострений (Me)

3.2. Особенности содержания иммунных биомаркеров и их связь с клинико-функциональными характеристиками больных по результатам кластерного анализа

Учитывая наличие взаимосвязи между тяжестью заболевания и частотой обострений, а также клинические и патофизиологические особенности перекрест-синдрома БА-ХОБЛ, для уточнения влияния этих параметров на уровень растворимых дифференцировочных молекул был проведен кластерный анализ. В

качестве категориальных группирующих переменных были использованы фенотип (БА-ХОБЛ, «изолированной» ХОБЛ), частота обострений (0 – 1 и ≥ 2 обострений в год) и спирометрическая тяжесть (GOLD I – IV). В результате больные были разделены 3 кластера, различавшиеся по уровню исследованных маркеров состояния иммунитета. Нормализованные значения растворимых дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости в разных кластерах представлены на рисунке 4.

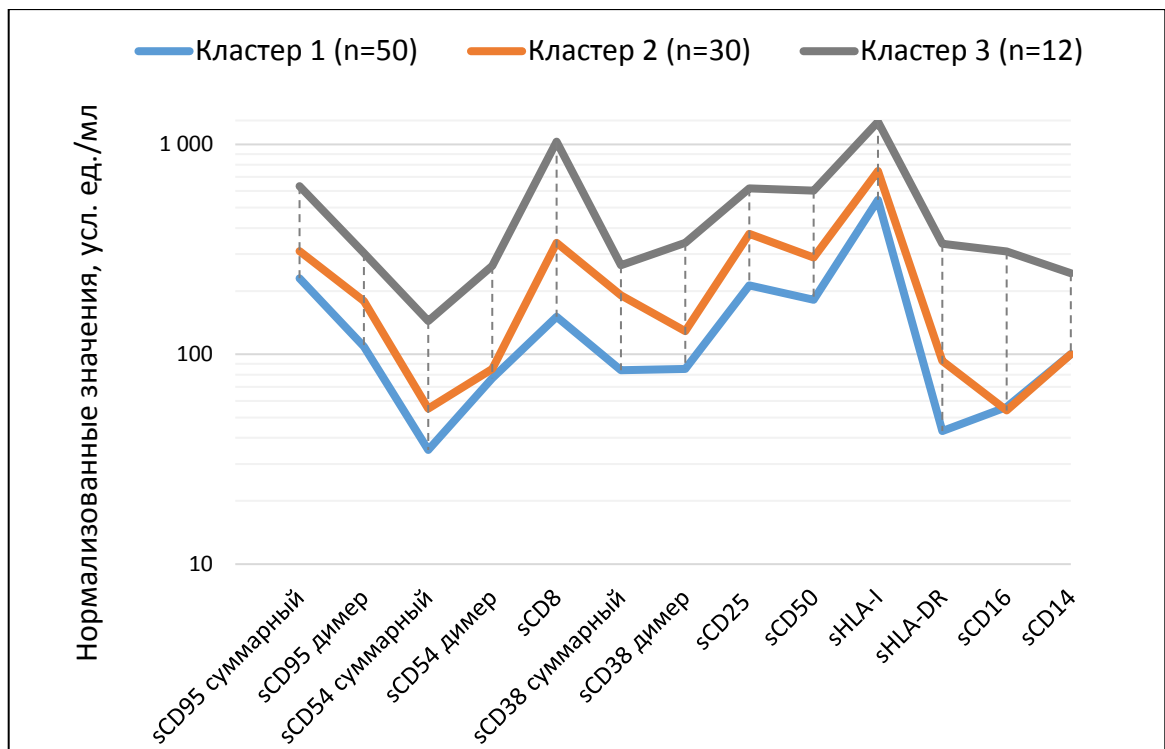


Рисунок 4. Нормализованные значения растворимых дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости в разных кластерах

В целом, для кластера 1 были характерны наиболее низкие значения растворимых дифференцировочных молекул, для кластера 3 – наиболее высокие, кластер 2 занимал промежуточное положение. Основная часть пациентов (87%) вошла в состав 1-го и 2-го кластеров; 3-й кластер был самым малочисленным и состоял из 12 больных. Распределение больных разных кластеров по степени тяжести, частоте обострений и фенотипу представлено в таблице 14. Больные ХОБЛ и БА-ХОБЛ встречались во всех кластерах. В кластере 1 с низким уровнем растворимых дифференцировочных молекул больные ХОБЛ встречались в 1,5 раза чаще по сравнению с БА-ХОБЛ, однако, различия находились в рамках

статистической тенденции ($p=0,068$); в других кластерах достоверных различий по частоте выявления разных фенотипов не было.

Вместе с тем, имелись отличия по распределению больных между кластерами в зависимости от тяжести заболевания и частоты обострений ($p<0,0001$ для обоих параметров). Практически все больные со степенью тяжести I-II и редкими обострениями вошли в кластер 2. Большинство больных со степенью тяжести III-IV и частыми обострениями (76,9-79,4%) оказалось в кластере 1 и 18,5-19,0% таких пациентов вошли в 3-й кластер.

Таблица 14

Распределение больных с разным фенотипом, степенью тяжести и частотой обострений по кластерам (количество (%) больных)

<i>Критерий</i>	Число больных	Кластер 1 (n=50)	Кластер 2 (n=30)	Кластер 3 (n=12)
<i>Фенотип</i>				
«Изолированная» ХОБЛ	67	40 (59,7)	20 (29,9)	7 (10,5)
БА – ХОБЛ	25	10 (40)	10 (40)	5 (20)
<i>Степень тяжести</i>				
GOLD I	13	0	13 (100)	0
GOLD II	14	0	14 (100)	0
GOLD III	39	28 (71,8)	3 (7,7)	8 (20,5)
GOLD IV	26	22 (84,6)	0	4 (15,4)
<i>Частота обострений</i>				
Редкие обострения	29	0	29 (100)	0
Частые обострения	63	50 (79,4)	1 (1,6)	12 (19)

Таким образом, независимыми характеристиками при распределении больных являлись тяжесть заболевания и частота обострений. Как было показано выше, фенотип БА-ХОБЛ оказывал влияние на содержание растворимых дифференцировочных молекул только на ранних стадиях заболевания при умеренной степени бронхиальной обструкции.

Пациенты разных кластеров различались по клиническим, лабораторным и спирометрическим характеристикам (таблицы 15 – 16). Поскольку подавляющее большинство больных было членами кластеров 1 и 2, в первую очередь сравнительный анализ проводили между ними.

Клинико-лабораторные характеристики пациентов разных кластеров
($M \pm SD$; $Me[0,25p;0,75p]$)

Показатель	Кластер 1 (n=50)	Кластер 2 (n=30)	Кластер 3 (n=12)	p ода	p между кластерами
<i>Клинические характеристики</i>					
Возраст, лет	61±9	57±14	69±7	0,034	$p_{1-2}=0,59$; $p_{1-3}=0,014$; $p_{2-3}=0,013$
Длительность заболевания, лет	18 [9;38]	13 [5;20]	12 [6;38]	0,039	$p_{1-2}=0,047$; $p_{1-3}=0,75$; $p_{2-3}=0,68$
Индекс курения, пачка-лет	40 [35;41]	23 [0;35]	40 [20;50]	0,0005	$p_{1-2}=0,002$; $p_{1-3}=0,73$; $p_{2-3}=0,036$
Число обострений в год	3,1±1,5	0,9±0,8	2,9±1,9	<0,0001	$p_{1-2}<0,0001$; $p_{1-3}=0,56$; $p_{2-3}=0,001$
САТ, баллы	22±7	13±6	24±9	0,01	$p_{1-2}=0,002$; $p_{1-3}=0,84$; $p_{2-3}=0,053$
mMRC, баллы	3±1	1±1	3±1	<0,0001	$p_{1-2}<0,0001$; $p_{1-3}=0,57$; $p_{2-3}<0,0001$
SpO ₂	93±6	96±2	95±2	0,79	$p_{1-2}=0,71$; $p_{1-3}=0,65$; $p_{2-3}=0,66$
<i>Лабораторные показатели</i>					
Лейкоциты крови, $\times 10^9/\text{л}$	8 [7;11]	8 [6;11]	9 [8;11]	0,57	$p_{1-2}=0,41$; $p_{1-3}=0,25$; $p_{2-3}=0,18$
Гемоглобин, г/л	149 [144;155]	153 [141;159]	140 [123;167]	0,78	$p_{1-2}=0,71$; $p_{1-3}=0,65$; $p_{2-3}=0,66$
СОЭ, мм/ч	15 [5;27]	12 [8;20]	11 [7;14]	0,79	$p_{1-2}=0,77$; $p_{1-3}=0,9$; $p_{2-3}=0,77$
СРБ > 6 мг/л, число (%) больных	3 (6)	2 (6,6)	3 (25)	-	$p_{1-2}=0,91$; $p_{1-3}=0,045$; $p_{2-3}=0,09$
Лейкоциты мокроты, клеток в поле зрения	16 [12;45]	12 [6;88]	74 [45;100]	0,94	$p_{1-2}=0,28$; $p_{1-3}=0,049$; $p_{2-3}=0,15$
Количество видов бактерий в мокроте	4±1	2±1	4±1	0,17	$p_{1-2}=0,17$; $p_{1-3}=0,9$; $p_{2-3}=0,4$
Бактериальная обсемененность, lg КОЕ/мл	8 [7;8]	6 [6;7]	6 [6;7]	0,09	$p_{1-2}=0,043$; $p_{1-3}=0,1$; $p_{2-3}=0,87$

Пациенты, вошедшие в кластер 1 (с наименьшим содержанием исследованных молекул), достоверно отличались от больных 2-го кластера (с более

высокими значениями растворимых форм мембранных антигенов) по ряду клинических характеристик. Длительность заболевания и индекс курения, число обострений в год, а также выраженность одышки (по шкале mMRC) и балл САТ-теста были выше у больных 1-го кластера, чем 2-го. Легочная гипертензия и хроническое легочное сердце в 1-м кластере выявлялись чаще, чем во 2-м (таблица 18). Рутинные лабораторные анализы достоверных различий между кластерами не выявили. Отмечалась тенденция к более высокой микробной обсемененности у больных 1-го кластера по сравнению со 2-м.

Поскольку больные с перекрест-синдромом ХОБЛ-БА встречались во всех кластерах, часть пациентов в каждом кластере получала комбинированные ингаляционные кортикостероиды на регулярной основе. Другим показанием для их назначения у больных ХОБЛ являлась тяжелая степень обструктивных нарушений и склонность к частым обострениям. В 1-м кластере ингаляционные кортикостероиды использовали 58% пациентов, что было чаще по сравнению со 2-м кластером, где их получали 30% больных ($p=0,017$). Однако различий по частоте применения локальных глюкокортикоидов между 1-м и 3-м кластерами (50% пациентов в 3-м кластере) не было, хотя содержание растворимых дифференцировочных молекул в этих кластерах существенно различалось. Также известно, что топические кортистероиды характеризуются высокой легочной и низкой системной биодоступностью. В связи с этим не было достаточных оснований считать, что регулярная терапия ингаляционными кортикостероидами оказывала влияние на результаты исследования содержания биомаркеров в циркулирующей крови.

Постбронходилатационные параметры ФВД также различались у больных первых двух кластеров: во 2-м кластере спирометрические показатели (ОФВ₁, ЖЕЛ, модифицированный индекс Тиффно, МОС50, МОС75) были достоверно выше, чем в 1-м кластере, различия ФЖЕЛ находились в пределах статистической тенденции (таблица 16).

Результаты исследования растворимых форм молекул клеток иммунной системы в разных кластерах представлены в таблице 17. При сравнении данных в

первых двух кластерах были выявлены достоверные различия в содержании антигенов sCD95 суммарного, sCD54 суммарного, sCD8, sCD38 суммарного, sCD25, sCD50, sHLA-DR. Таким образом, больные кластера 1 наряду с более тяжелым течением заболевания, склонностью к частым обострениям и выраженными обструктивными нарушениями, отличались от кластера 2 также более низким уровнем растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток.

Таблица 16

Показатели ФВД у больных разных кластеров (постбронходилатационные показатели, % должной величины, $M \pm SD$)

Показатель	Кластер 1 (n=50)	Кластер 2 (n=30)	Кластер 3 (n=12)	p ода	p между кластерами
ЖЕЛ	62±12	82±25	65±13	0,0002	$p_{1-2}=0,0002$; $p_{1-3}=0,42$; $p_{2-3}=0,011$
ОФВ ₁	33±10	80±27	35±11	<0,0001	$p_{1-2}<0,0001$; $p_{1-3}=0,59$; $p_{2-3}<0,0001$
ФЖЕЛ	41±12	71±22	43±11	0,039	$p_{1-2}=0,005$; $p_{1-3}=0,55$; $p_{2-3}=0,04$
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, %	51±13	64±10	51±15	<0,0001	$p_{1-2}=0,004$; $p_{1-3}=0,98$; $p_{2-3}=0,002$
ПОС	30±9	52±24	50±15	0,024	$p_{1-2}=0,037$; $p_{1-3}=0,04$; $p_{2-3}=0,85$
МОС25	32±16	79±39	55±13	0,007	$p_{1-2}<0,0001$; $p_{1-3}=0,08$; $p_{2-3}=0,0001$
МОС50	12±7	49±29	17±12	<0,0001	$p_{1-2}<0,0001$; $p_{1-3}=0,17$; $p_{2-3}=0,0001$
МОС75	12±7	56±23	18±12	<0,0001	$p_{1-2}=0,001$; $p_{1-3}=0,02$; $p_{2-3}=0,001$

Кластер 3 отличался высоким уровнем растворимых дифференцировочных антигенов. Так, концентрации антигенов sCD95 (суммарного и димера), sCD54 суммарного, sCD8, sCD38 (суммарного и олигомера), sCD25, sCD50, sCD16 и sHLA-DR в 3-м кластере были повышены по сравнению как с 1-м и 2-м кластерами, так и с донорами, а концентрации димера sCD54, молекул sHLA-I не отличались от значений доноров, но были выше, чем в первых двух кластерах. Уровень маркера нейтрофилов sCD14 был повышен только в 3-м кластере.

Содержание растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов и молекул гистосовместимости в разных кластерах (Me[0,25p;0,75p])

Показатель, усл. ед./мл	Кластер 1 (n=50)	Кластер 2 (n=30)	Кластер 3 (n=12)	$P_{ода}$	p между кластерами
sCD95 суммарный	↓230[157;296]	310[231;415]	↑632 [369;1013]	0,13	$p_{1-2}=0,003$; $p_{1-3}<0,0001$; $p_{2-3}=0,012$
sCD95 димер	↓109 [88;236]	↓179 [88;220]	↑304 [259;919]	0,006	$p_{1-2}=0,38$; $p_{1-3}<0,0001$; $p_{2-3}=0,0001$
sCD54 суммарный	↓35 [23;59]	55 [23;76]	↑144 [89;197]	0,006	$p_{1-2}=0,012$; $p_{1-3}<0,0001$; $p_{2-3}=0,0005$
sCD54 димер	↓77 [30;131]	↓85 [34;113]	264 [117;536]	0,004	$p_{1-2}=0,82$; $p_{1-3}=0,0005$; $p_{2-3}=0,0013$
sCD8	↓151 [70;327]	340 [158;426]	↑1031 [813;1385]	0,004	$p_{1-2}=0,0025$; $p_{1-3}<0,0001$; $p_{2-3}<0,0001$
sCD38 суммарный	↓84 [45;122]	191 [130;261]	↑266 [214;481]	0,009	$p_{1-2}<0,0001$; $p_{1-3}<0,0001$; $p_{2-3}=0,044$
sCD38 димер	↓85 [54;236]	↓129 [60;220]	↑340 [247;394]	0,007	$p_{1-2}=0,47$; $p_{1-3}=0,0009$; $p_{2-3}=0,002$
sCD25	↓213 [149;400]	375 [233;462]	↑618 [529;841]	0,093	$p_{1-2}=0,0022$; $p_{1-3}<0,0001$; $p_{2-3}=0,0007$
sCD50	↓182 [152;293]	↓289 [179;321]	↑602 [406;1163]	0,025	$p_{1-2}=0,0093$; $p_{1-3}<0,0001$; $p_{2-3}<0,0001$
sHLA-I	↓544[346;1319]	↓747 [352;960]	1282 [552;1740]	0,012	$p_{1-2}=0,48$; $p_{1-3}=0,086$; $p_{2-3}=0,13$
sHLA-DR	↓43 [28;99]	93 [79;126]	↑336 [244;444]	0,006	$p_{1-2}=0,003$; $p_{1-3}<0,0001$; $p_{2-3}<0,0001$
sCD16	↓56 [49;97]	↓54 [48;61]	↑309 [308;415]	< 0,001	$p_{1-2}=0,81$; $p_{1-3}=0,0065$; $p_{2-3}=0,018$
sCD14	100 [85;156]	100 [89;109]	↑243 [53;280]	0,01	$p_{1-2}=0,68$; $p_{1-3}=0,04$; $p_{2-3}=0,23$

Примечание: ↓ понижен по сравнению с донорами при $p<0,01$; ↑ повышен по сравнению с донорами при $p<0,05$

По клинико-функциональным особенностям больные 3-го кластера характеризовались более тяжелым течением по сравнению с пациентами 2-го кластера. В 3-й кластер, как и в 1-й, входили больные с частыми обострениями, имевшие тяжелую и крайне тяжелую степень бронхиальной обструкции,

выраженную одышку и симптомы, длительный анамнез заболевания и высокий индекс курения. Однако, больные в 3-м кластере были, в среднем, на 8 – 10 лет старше, чем пациенты кластеров 1 и 2 (таблица 15). В 3-м кластере чаще встречалась ассоциированная с возрастом значимая сердечно-сосудистая патология (стенокардия напряжения 3-4 функционального класса, фибрилляция предсердий, желудочковая экстрасистолия, сердечная недостаточность 3-4 функционального класса и т.д.): различия частот были достоверны по сравнению со 2-м кластером и находились в пределах тенденции при сравнении с 1-м кластером (таблица 18). Поражения сердечно-сосудистой системы относятся к наиболее частым сопутствующим состояниям при бронхообструктивных заболеваниях, причем это сочетание обуславливает неблагоприятный прогноз [127]. Наличие сопутствующей сердечно-сосудистой патологии связано с системными реакциями, которые у больных ХОБЛ, прежде всего, развиваются под влиянием воспалительной активности клеток легочной ткани, тканевой гипоксии, неблагоприятного влияния одышки на метаболизм, а также таких факторов риска, как табакокурение, промышленные поллютанты, предрасполагающие к развитию системных реакций генетические факторы [142]. Признаки ремоделирования правых отделов сердца встречались у пациентов 1-го и 3-го кластера; различий по частоте выявления между этими кластерами не было. У 35,9% больных ХОБЛ наблюдались изменения эритроцитарного ростка крови (анемии и эритроцитозы), при этом средний уровень гемоглобина крови не выходил за границы нормальных значений и достоверных различий по среднему показателю между кластерами не было. Однако, у больных 3-го кластера в 3 раза чаще по сравнению с другими выявлялась анемия I-II степени тяжести (таблица 18), которая расценивалась как анемия хронических болезней вследствие персистирующего воспалительного процесса [375], и чаще определялся уровень маркера системного воспаления СРБ превышающий 6 мг/л (таблица 15). При этом положительный СРБ (в качественном и полуколичественном тестах) даже у больных с высоким уровнем иммунных маркеров (т.е., в 3-м кластере) выявлялся только в 25% случаев. Различий в содержании лейкоцитов крови и СОЭ между кластерами не было, что говорит о

недостаточной информативности рутинных лабораторных тестов для оценки системного воспаления при стабильной ХОБЛ. Среднее количество лейкоцитов мокроты, характеризующее выраженность локального воспаления, у больных 3-го кластера было выше по сравнению с 1-м кластером (таблица 15). Увеличение гнойности мокроты в сочетании с повышенным содержанием нейтрофильного антигена sCD14 и адгезивных молекул в кластере 3 может быть обусловлено активацией бактериальной флоры, колонизирующей дыхательные пути этих больных.

Таблица 18

Частота встречаемости сопутствующих заболеваний в разных кластерах
(количество (%) больных)

Сопутствующие заболевания	Кластер 1 (n=50)	Кластер 2 (n=30)	Кластер 3 (n=12)	p
Стенокардия напряжения 3-4 ФК, фибрилляция предсердий, сердечная недостаточность 3-4 ФК и т.п.	16 (32)	7 (23,3)	7 (58,3)	$p_{1-2}=0,41$; $p_{1-3}=0,09$; $p_{2-3}=0,029$
Анемия хронических болезней	7 (14)	4 (13,3)	5 (41,7)	$p_{1-2}=0,93$; $p_{1-3}=0,029$; $p_{2-3}=0,043$
Вторичный эритроцитоз	12 (24)	3 (10)	2 (16,7)	$p_{1-2}=0,12$; $p_{1-3}=0,61$; $p_{2-3}=0,59$
Гипертрофия правых отделов сердца	32 (64)	0	7 (58,3)	$p_{1-2}=0,006$; $p_{1-3}=0,41$; $p_{2-3}=0,001$

При последующем наблюдении в течение 6 месяцев у 29 больных были зарегистрированы умеренно тяжелые и тяжелые обострения: 19 пациентов (38%) 1-го кластера, 5 пациентов (16,7%) 2-го кластера, 5 пациентов (41,7%) 3-го кластера. Как видно из таблицы 19, за период последующего наблюдения во 2-м кластере было в 2,3 – 2,5 раза меньше обострений по сравнению с 1-м и 3-м кластерами (достоверных различий между двумя последними не было). При этом кластер 3 отличался от остальных самым коротким периодом времени до развития обострения (в среднем, 1 месяц против 3,3 – 4,5 месяцев в других кластерах).

Таким образом, несмотря на то, что 1-й и 3-й кластер были сопоставимы по спирометрической тяжести и частоте обострений, у пациентов 3-го кластера чаще выявлялись лабораторные маркеры активности локального и системного

воспаления. При этом изменения профиля растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток при стабильной ХОБЛ проявляли более высокую чувствительность по сравнению с рутинными лабораторными тестами, характеризующими системное воспаление (лейкоциты крови, СОЭ, СРБ, анемия). Нарастание уровня биомаркеров иммунных клеток являлось предиктором обострения и свидетельствовало о недостаточной эффективности противовоспалительной терапии.

Таблица 19

Результаты мониторинга умеренно тяжелых и тяжелых обострений в течение 6 месяцев последующего наблюдения больных разных кластеров

Показатель	Кластер 1 (n=50)	Кластер 2 (n=30)	Кластер 3 (n=12)	p
Число (%) больных с обострением	19 (38)	5 (16,7)	5 (41,7)	$p_{1-2}=0,042$; $p_{1-3}=0,81$; $p_{2-3}=0,086$
Время до следующего обострения, дни, Me [0,25p; 0,75p]	100 [90; 119]	137 [100; 140]	30 [21; 70]	$p_{1-2}=0,37$; $p_{1-3}=0,03$; $p_{2-3}=0,01$

С другой стороны, нельзя не учитывать, что ассоциированная с возрастом сердечно-сосудистая патология, которая в 3-м кластере встречалась все-таки чаще, чем в других, тоже может сопровождаться воспалительными изменениями и сдвигами со стороны различных биомаркеров, например, молекул алгезии [277], однако достоверных различий по частоте этих заболеваний между 1-м и 3-м кластерами не было.

3.3. Изменения содержания иммунных маркеров при обострении хронической обструктивной болезни легких

Для уточнения влияния выраженности воспаления на уровень иммунных маркеров у 29 пациентов было изучено содержание растворимых форм мембранных молекул клеток иммунной системы в разные фазы заболевания: при стабильном течении и в период обострения (таблица 20 и рисунок 5). У больных имелись признаки инфекционного обострения, которое послужило причиной госпитализации: повышение температуры тела у 20 из 29 (69%), увеличение

продукции и гнойности мокроты у 27 из 29 (93%), всем назначались антибактериальные препараты.

В период обострения отмечалось достоверное повышение уровня растворимых антигенов CD95 суммарного и димера, CD54 суммарного, CD8, CD38 суммарного, CD25, CD50, HLA-DR и тенденция к повышению димера sCD54 по сравнению со стабильной фазой заболевания (таблица 20).

Таблица 20

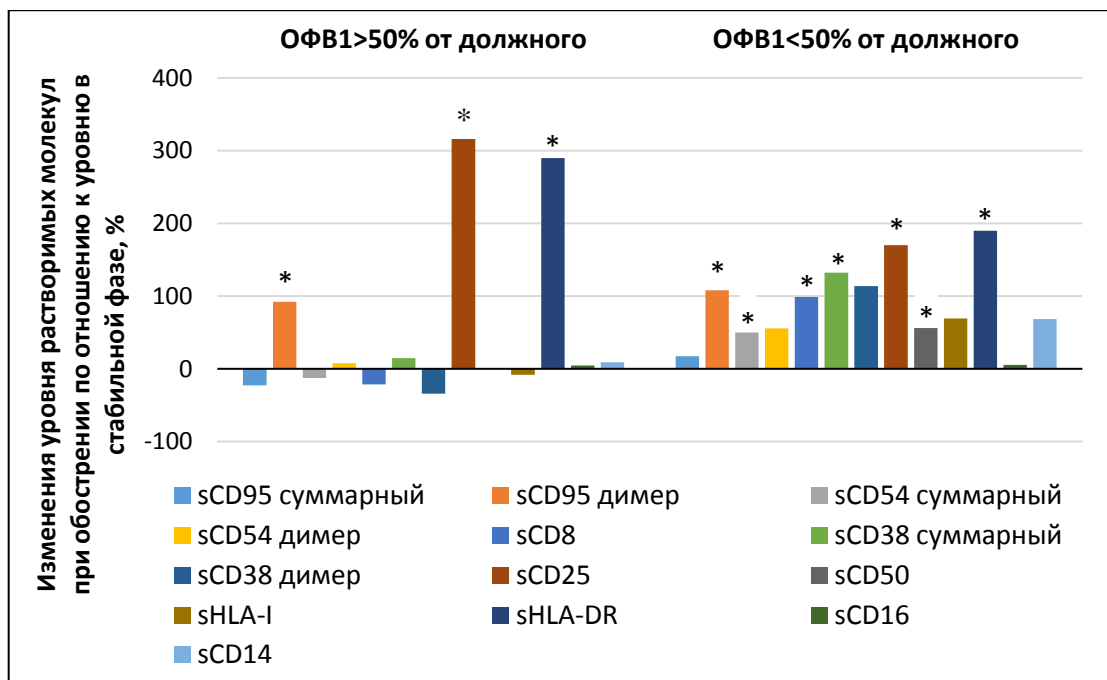
Содержание растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов и молекул гистосовместимости у больных ХОБЛ при стабильном течении и в фазе обострения (представлены Me[0,25p;0,75p])

Показатель, усл.ед./мл	Доноры (n=40)	ХОБЛ (n=29)		P стабильное течение - обострение
		Стабильное течение	Обострение	
sCD95 суммарный	377[359;394]	282[205;391]*	347[240;620]	0,01
sCD95 димер	250[238;260]	101[69;278]*	198[155;297]*	0,02
sCD54 суммарный	63[58;69]	40[23;61]*	77[64;92]*	0,005
sCD54 димер	151[142;184]	82 [28;159]*	132[91;223]*	0,06
sCD8	376[358;385]	285[88;421]	566[326;613]*	0,005
sCD38 суммарный	197[173;212]	77[37;193]*	130[153;253]*	0,005
sCD38 димер	256[238;269]	146[63;303]*	170[112;315]*	0,77
sCD25	398[380;420]	140[12;302]*	352[364;605]	0,0006
sCD50	354[339;368]	285[165;314]*	346[282;420]	0,005
sHLA-I	991[949;1089]	886[410;1187]	984[585;1422]	0,19
sHLA-DR	98[89;104]	30[7;96]*	88[80;192]	0,002
sCD16	129[98;140]	60[49;88]*	69[50;74]*	0,73
sCD14	118[87;137]	101[76;188]	145[91;173]*	0,89

* p<0,05 при сравнении с группой здоровых доноров

При стабильной фазе заболевания у этих больных сывороточное содержание 10 из 13 растворимых дифференцировочных антигенов было ниже, чем у доноров. При обострении ХОБЛ медианные значения суммарного антигена sCD54, молекул sCD8 и sCD14 превысили уровень здоровых доноров; концентрации димеров sCD95 и sCD54, а также суммарного антигена sCD38 оставались ниже нормального уровня, но повысились по сравнению с периодом стабильного течения. Не изменилось только содержание димера sCD38 и антигена sCD16, оставаясь на

низком уровне. Таким образом, при обострении ХОБЛ наблюдалось увеличение концентраций 8 из 13 исследованных сывороточных антигенов по сравнению как с исходным уровнем, так и с контрольной группой, хотя степень повышения была различной. Наиболее высокая степень прироста (в 2 – 3 раза) была характерна для ключевых маркеров инициации иммунного ответа sCD25 и sHLA-DR, растворимого антигена цитотоксических Т-лимфоцитов CD8, играющих важную роль в патогенезе ХОБЛ, и димерных фракций рецептора sFas. Содержание остальных молекул (суммарных фракций антигенов sCD95, sCD38, sCD54 и молекул sCD50) увеличилось, в среднем, в 1,5 раза по сравнению со стабильной фазой. Изменения уровня сывороточных антигенов при обострении были изучены и в подгруппах больных с разной тяжестью бронхиальной обструкции, которые различались уровнем иммунных маркеров в стабильной фазе (рисунок 5).



* изменения достоверны при $p < 0,05$

Рисунок 5. Изменения содержания растворимых дифференцировочных молекул при обострении по сравнению со стабильной фазой у больных ХОБЛ разной степени тяжести

При I – II степени тяжести зарегистрирован 4-х кратный прирост концентрации антигенов sCD25 и sHLA-DR и 2-х кратное увеличение олигомерных фракций sCD95. При III – IV степени тяжести, с более низким исходным уровнем маркеров состояния иммунитета, содержание димера sCD95, суммарных антигенов

sCD38 и sCD54, антигенов sCD8, sCD25, sCD50, молекул sHLA-DR выросло в 1,5 – 2,5 раза. Менее выраженная степень увеличения биомаркеров на фоне обострения у этих больных может свидетельствовать об истощении механизмов иммунной защиты, характерном для тяжелой и крайне тяжелой ХОБЛ.

3.4. Обсуждение результатов

Изучение комплекса растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов у больных ХОБЛ позволило выявить особенности их содержания в зависимости от клинических особенностей и фазы течения заболевания. Кластерный анализ показал, что независимыми факторами, влиявшими на содержание растворимых форм мембранных антигенов иммунных клеток у больных стабильной ХОБЛ, являлись степень тяжести и частота обострений. При стабильной ХОБЛ без признаков воспалительной активности низкий уровень растворимых форм молекул адгезии, гистосовместимости, дифференцировочных и активационных маркеров лимфоцитов, рецептора апоптоза ассоциировался с более тяжелым течением, склонностью к частым обострениям и выраженными бронхообструктивными нарушениями (таблицы 15 – 17).

Выявленное снижение сывороточного уровня маркеров состояния иммунитета у больных тяжелой/крайне тяжелой ХОБЛ требует объяснения. Потенциально угнетающее действие стероидов и антибиотиков на клеточную экспрессию и сывороточный уровень антигенов можно исключить, так как пациенты не получали системной стероидной и антибактериальной терапии в течение 1 месяца до включения, а доля больных, получавших иГК, существенно не различалась в кластерах с высоким и низким уровнем растворимых дифференцировочных антигенов.

Возможным объяснением полученных результатов может быть усиление секвестрации нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов в микроциркуляторном русле и паренхиме легких при тяжелой и крайне тяжелой ХОБЛ. Экспериментальные исследования показали, что аккумулярованные в очаге поражения нейтрофилы являются наиболее активными [222], а в циркуляции остаются клеточные субпопуляции с менее выраженной экспрессией антигенов,

что находит отражение в уменьшении сывороточных концентраций их растворимых гомологов. Неоднократно было показано, что уровень sICAM-1 в плазме коррелирует со степенью экспрессии на сосудистом эндотелии. В связи с этим снижение содержания адгезивных молекул в сыворотке крови может быть связано с ослаблением клеточной экспрессии молекул адгезии на поверхности эндотелия и/или с уменьшением общей популяции эндотелиальных клеток. Обе гипотезы поддерживаются литературными данными. С одной стороны, нарушения функции эндотелия были выявлены у курильщиков и пациентов ХОБЛ [238, 266]. С другой стороны, при тяжелой ХОБЛ наблюдается облитерация и редукция легочного сосудистого русла [139]. Тем самым полученные данные об изменениях содержания sICAM-1 и sICAM-3 поддерживают концепцию существования эндотелиальной дисфункции (в легочном и системном кровообращении) при тяжелой форме ХОБЛ. Дисбаланс в системе молекул адгезии ведет к нарушению процесса рекрутирования клеток, что может иметь различные последствия. С одной стороны, ослабление миграции является одним из способов сдерживания чрезмерного деструктивного воздействия нейтрофилов на легочную ткань. С другой стороны, торможение активной миграции лейкоцитов затрудняет эффективную борьбу с возбудителем воспалительного процесса. Так, в экспериментальной модели индуцированной ХОБЛ/эмфиземы легких снижение клеточной экспрессии ICAM-1 сопровождалось нарушением легочного клиренса нетипируемой *Haemophilus influenzae*, одного из основных бактериальных возбудителей при ХОБЛ [228].

Согласно литературным данным на поздних стадиях ХОБЛ усиливается апоптоз цитотоксических Т-лимфоцитов, эндотелиальных и эпителиальных клеток [184], что влияет на процессы перестройки легочной ткани. Индукторами апоптоза являются свободные радикалы, экзотоксины Грамм-положительных возбудителей и эндотоксины энтеробактерий. Для обследованных нами больных 1 кластера, отличающихся выраженными бронхообструктивными нарушениями и частыми обострениями, было характерно увеличение как индекса курения, так и бактериальной обсемененности бронхиального дерева (таблица 15), т.е. факторов,

способных приводить к индукции процессов программируемой клеточной смерти. С другой стороны, была нарушена и регуляция апоптоза. Выявленное у этих пациентов снижение уровня растворимого Fas рецептора ведет к ослаблению его ингибирующего влияния на индукцию апоптоза (таблица 17). В результате усиления программируемой гибели иммунокомпетентных клеток уменьшается содержание растворимых форм дифференцировочных и активационных маркеров лимфоцитов (sCD8, sCD16, sCD25, sCD38) и молекул гистосовместимости при прогрессировании заболевания (таблица 17). Следствием усиления апоптоза альвеолярного эпителия и эндотелия и нарушения нормальных репарационных процессов является ремоделирование легочной ткани, включающее развитие рубцовой ткани в стенке бронха, склероз межальвеолярных перегородок, деструктивные процессы с формированием эмфиземы легких, запустевание микроциркуляторного русла и другие процессы [139]. Выраженные фиброзно-деструктивные изменения и иммунная недостаточность, характерные для тяжелой ХОБЛ, могут лежать в основе уменьшения сывороточного уровня биомаркеров в этой группе больных.

В рамках этого обсуждения стоит остановиться на исследовании, выполненном недавно Н.И. Кубышевой (2012) и показавшем, что прогрессирование бронхиальной обструкции при ХОБЛ сопряжено с повышением содержания растворимых молекул гистосовместимости I и II класса, sCD54 молекул, комплексов sHLA-I:CD8 и снижением уровня sCD95, sCD8 белков в сыворотке крови [63]. Повышенный уровень растворимых молекул адгезии при ХОБЛ был выявлен и другим коллективом авторов [207]. На первый взгляд, эти результаты противоречат данным, представленным в настоящей работе. Однако существует ряд методологических различий. Во-первых, цитируемые исследования биомаркеров не включали больных крайне тяжелой ХОБЛ, что отчасти может быть связано с преобладанием в реальной клинической практике пациентов, соответствующих GOLD II [23, 38]. Между тем, как было показано выше, высокая степень тяжести оказывает модифицирующее влияние на уровень иммунных биомаркеров. Так, A. Noguera et al. (1998) у больных тяжелой и крайне

тяжелой ХОБЛ (средний $ОФВ_1$ составлял $33,5 \pm 2,8\%$ от должной величины) обнаружили достоверное снижение сывороточных концентраций sICAM-1 [238], что позднее подтверждалось и данными отечественных ученых [66]. Кроме того, Н.И. Кубышева исследовала больных в период обострения заболевания, что с одной стороны, объясняет более высокие значения маркеров воспаления и активации клеток и, с другой стороны, обуславливает более низкие показатели легочной функции по сравнению со стабильной фазой. Различия результатов, получаемых при изучении молекулярных биомаркеров, демонстрируют гетерогенность популяции больных ХОБЛ.

В связи с этим важно было оценить маркеры иммунных клеток при фенотипе сочетания ХОБЛ с БА. Влияние перекрест-синдрома носило относительный характер и наблюдалось только на ранних стадиях заболевания. Известно, что больные ХОБЛ с сопутствующей БА могут иметь также и перекрест иммунных реакций с активацией различных звеньев иммунной системы и сочетанием эозинофильного и нейтрофильного типа воспалительного ответа [244]. В связи с этим закономерно, что перекрест-синдром проявлялся другим спектром изменений со стороны разных классов растворимых дифференцировочных молекул по сравнению с «изолированной» ХОБЛ (таблицы 10 – 11). У больных БА-ХОБЛ с $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного в отличие от пациентов «изолированной» ХОБЛ аналогичной тяжести отмечен высокий уровень антигена sCD25 (таблица 11), растворимого рецептора интерлейкина-2, который продуцируется стимулированными Т-клетками и является одним из ключевых медиаторов воспаления и инициации иммунного ответа, в том числе гуморального [76]. Ранее разными авторами было показано участие молекул CD25 в патогенезе бронхиальной астмы и выявлено повышение, как клеточной экспрессии этих антигенов, так и их содержания в биологических жидкостях [44, 96, 343]. Обнаруженное у больных с ранними стадиями БА-ХОБЛ высокое содержание антигенов sCD95 (Fas/Apo-1) и молекул sHLA-I (таблица 11) отражает активацию Т-клеточного звена, а также участие субпопуляции цитотоксических $CD8^+$ лимфоцитов, инфильтрирующих легочную ткань при ХОБЛ. Функциональная

взаимосвязь между молекулами CD95, HLA-I и CD8 была доказана экспериментальным путём другими авторами. Рецептор-лигандное взаимодействие sHLA-I с антигеном CD8 на поверхности лимфоцитов индуцирует секрецию растворимых молекул CD95 [354], накопление которых в микроокружении лимфоцитов может препятствовать реализации Fas-зависимого апоптоза, например, апоптоза активированных лимфоцитов [151], что вносит вклад в патогенез аутоиммунных и аллергических заболеваний. Сывороточный уровень растворимых форм антигена CD8, а также молекул адгезии (sCD50, димер sCD54), олигомерных и суммарных фракций антигена CD38, которые участвуют в развитии бронхиальной обструкции, иммуновоспалительных и аллергических реакций [198], у пациентов с перекрест-синдромом был повышен по сравнению с больными ХОБЛ при $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного (таблица 11), хоть и не выходил за границы нормальных значений. Это указывало на вовлечение различных клеточно-молекулярных факторов в развитие воспаления при перекрест-синдроме, что сопровождалось отягощением клинической симптоматики (степени одышки и значений САТ-теста). Модифицирующее влияние сочетания БА с ХОБЛ на патогенетические механизмы и клиническую картину было продемонстрировано и другими авторами [100, 186]. При прогрессировании хронического воспаления начинают преобладать процессы ремоделирования бронхов и легочной паренхимы с фиброзированием дыхательных путей и эмфизематозной перестройкой легких, облитерацией сосудистого русла и развитием легочной гипертензии, приводящие к тому, что при продвинутых стадиях заболевания нивелируются особенности иммунного ответа, характерные для перекрест-синдрома. У больных с тяжелой и крайне тяжелой степенью ХОБЛ и БА-ХОБЛ содержание растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов снижается независимо от фенотипа.

Другим аспектом исследования иммунного ответа при сочетании БА и ХОБЛ являются выделение особенностей перекрест-синдрома, отличающих его от «изолированной» астмы. В проведенном недавно исследовании у больных БА наблюдался высокий уровень суммарного sCD38 антигена и молекул sHLA-DR, участвующих в индукции антителообразования, а при тяжелом течении

увеличивались по сравнению с донорами также концентрации суммарных фракций sCD54 молекул, антигенов sCD25, sCD8 и sCD95 [66]. Таким образом, с учетом собственных и литературных данных можно предположить, что более высокое содержание сывороточных маркеров активации гуморального иммунитета и нарастающая динамика растворимых дифференцировочных молекул при прогрессировании заболевания отличают профиль исследованных биомаркеров при БА от сочетания с ХОБЛ и от «изолированной» ХОБЛ.

Согласно полученным данным фенотип ХОБЛ с частыми обострениями характеризовался не только выраженной клинической симптоматикой и тяжелыми бронхообструктивными нарушениями, но и низким уровнем практически всех исследованных биомаркеров (таблицы 12, 13). В отличие от них у пациентов с редкими обострениями концентрации молекул sHLA-DR, sCD25, sCD8, суммарных антигенов sCD54, sCD95, sCD38 находились в пределах нормальных значений; содержание двух последних антигенов достоверно различалось в зависимости от частоты обострений. Сниженное содержание биомаркеров указывало на нарушения со стороны различных звеньев иммунной системы, что сопровождалось ослаблением противоинфекционной защиты и частым возникновением обострений.

Влияние фазы заболевания на содержание лейкоцитарных антигенов демонстрируют результаты, полученные нами при исследовании пациентов в динамике: при обострении ХОБЛ отмечено нарастание уровней молекул адгезии и гистосовместимости II класса, активационных маркеров sCD38 и sCD25 по отношению к стабильной фазе, что отражает усиление воспалительных сдвигов. Высокие концентрации суммарных антигенов sCD54 и молекул sCD14 в период обострения, выходящие за рамки контрольных значений, можно рассматривать в качестве маркеров инфекционного характера обострения, которое имело место у обследованных пациентов. Не так давно было показано, что избыточное содержание sCD14 и sCD54 в циркуляции связано с инфекционным генезом системной воспалительной реакции организма [209]. При исследовании различных молекулярных фракций большая информативность была характерна для

суммарных антигенов. При обострении увеличились концентрации суммарных фракций молекул sCD54, sCD38 и sCD95, в то время как содержание димеров sCD54 и sCD38 достоверно не изменилось.

Существенное увеличение sCD8 в период обострения, прежде всего у больных с $\text{ОФВ}_1 < 50\%$ должного, отражает ключевую патогенетическую роль субпопуляции CD8^+ Т-лимфоцитов, которые инфильтрируют субэпителиальные отделы крупных и мелких бронхов и паренхиму легких, включая альвеолярные стенки и артерии, и считаются биологическим маркером ХОБЛ [327]. Видимо, усиление клеточной экспрессии молекул CD8 сопровождается увеличением их шеддинга и ведет к нарастанию содержания циркулирующих растворимых форм.

Важным моментом с практической точки зрения явилось обнаружение у 13% больных со стабильной ХОБЛ лабораторных признаков активности воспалительного процесса, которые лучше всего выявлялись при исследовании пула растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов. При тяжелой и крайне тяжелой степени бронхообструктивных нарушений доля пациентов с высоким уровнем иммунных биомаркеров увеличилась до 18% (таблица 14). Последующее наблюдение показало, что у 41,7% этих больных в течение следующего месяца развивается умеренное или тяжелое обострение ХОБЛ. Увеличение содержания растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов могло свидетельствовать о недостаточной эффективности регулярной терапии и указывать на необходимость коррекции лечения. Исследование биомаркеров особенно актуально для тяжелых больных с $\text{ОФВ}_1 < 50\%$ должного и персистирующими симптомами, маскирующими начинающееся ухудшение, что может привести к несвоевременному началу лечения обострения (т.е. для пациентов группы D при комплексной оценке ХОБЛ).

Таким образом, выявлены особенности состояния пула иммунных маркеров, характеризующие различные клинические варианты течения ХОБЛ. Фенотип ХОБЛ с частыми обострениями отличался от доноров и больных с редкими обострениями понижением уровня растворимых форм мембранных молекул лейкоцитов (sCD95, sCD38, sCD8, sCD25, sCD54, sHLA-DR), что сопровождалось

усилением симптомов (САТ-тест, mMRC) и функциональных нарушений. Фенотип перекреста БА-ХОБЛ характеризовался большей выраженностью одышки и других симптомов при тенденции к меньшей интенсивности курения по сравнению с «изолированной» ХОБЛ аналогичной тяжести. На ранних стадиях перекрест-синдрома БА-ХОБЛ повышено содержание молекул sICAM-1, sICAM-3, sCD8, sCD38 по сравнению с «изолированной» ХОБЛ и антигенов sCD95, sCD25, sHLA-I по сравнению с донорами. Прогрессирование бронхообструктивных нарушений ассоциировано с низким уровнем маркеров состояния иммунитета. При стабильной ХОБЛ нарастание сывороточных концентраций растворимых дифференцировочных лейкоцитарных молекул являлось предиктором обострения ХОБЛ и могло свидетельствовать о недостаточной эффективности регулярной терапии. В фазе обострения содержание растворимых антигенов CD54, CD50, CD95, CD8, CD38, CD25 и HLA-DR увеличивалось в 1,5-3 раза по сравнению со стабильной фазой, отражая усиление воспалительной активации клеток. Мониторинг растворимых молекул иммунных клеток может быть использован для прогнозирования тяжести ХОБЛ и развития обострений, оценки активности воспаления и эффективности противовоспалительной терапии. Изучение тонких механизмов иммунных нарушений при различных клинических вариантах ХОБЛ способствует развитию персонализированного подхода к терапии.

ГЛАВА 4. СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ, ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ И ПЕРСИСТЕНЦИИ БАКТЕРИЙ

4.1. Оценка микробного пейзажа респираторного тракта при хронической обструктивной болезни легких

Микробиоценоз нижних дыхательных путей оценивался при исследовании мокроты и бронхоальвеолярной жидкости. У 31 больного было проведено одновременное микробиологическое исследование биообразцов, полученных при свободном откашливании и при бронхоскопии. При сопоставлении результатов анализов сходство по 1 – 3 видам микроорганизмов наблюдалось у 26 (83,9%) пациентов, что позволило ограничиться исследованием мокроты у остальных пациентов.

Микробный пейзаж нижних дыхательных путей при исследовании мокроты и БАЛ у больных ХОБЛ был представлен 18 родами микроорганизмов – Streptococcus, Neisseria, Stomatococcus, Staphylococcus, Corynebacterium, Moraxella, Haemophilus, Flavobacterium, Pseudomonas, Acinetobacter, Alcaligenes, Escherichia, Proteus, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia и Candida. Частота выделения микроорганизмов со слизистых верхних и нижних дыхательных путей представлена в таблице 21. Наиболее часто в содержимом бронхиального дерева высевались стрептококки α - и β -гемолитические (соответственно 78,0% и 16,1% случаев), нейссерии (23,7%), стоматококки (22,9%) и стафилококки (22,0% случаев; среди них половину составляли изоляты золотистого стафилококка). Эти же микроорганизмы были основными и в биоценозе зева. Представители семейства энтеробактерий (эшерихии, протей, клебсиеллы, энтеробактеры, цитробактеры, серрации) встречались у 24,6% больных. Неферментирующие грамотрицательные бактерии, такие как псевдомонады, ацинетобактеры, алкалигенес, флавобактерии, были выделены у 17,8% больных; при этом на долю синегнойной палочки приходилось 5,1%. Пневмококки были выделены только в 6,8% случаев, гемофильные палочки – в 2,5% случаев, а моракселлы – у 5,1% больных ХОБЛ. В целом микробная

флора присутствовала в мокроте/БАЛ у 84,7% больных стабильной ХОБЛ; в 28,8% случаев в виде микробных ассоциаций (таблицы 21, 22).

Таблица 21

Частота выделения микроорганизмов со слизистой верхних и нижних дыхательных путей у больных ХОБЛ (количество (%) больных)

Микробный пейзаж различался у больных ХОБЛ с разной степенью

Источник	Мокрота/БАЛ	Зев	Нос
Количество больных	118 больных	109 больных	104 больных
Микроорганизмы			
<i>Грам+ бактерии</i>	185 изолятов	172 изолята	72 изолята
α -гемолитические стрептококки	92 (78,0)	97 (89,0)	2 (1,8)
β -гемолитические стрептококки	19 (16,1)	12 (11,0)	1 (0,9)
<i>S. pneumoniae</i>	8 (6,8)	0	1 (0,9)
<i>Staphylococcus spp.</i>	26 (22,0)	17 (15,6)	60 (55,0)
– в том числе <i>S.aureus</i>	12 (10,2)	5 (4,6)	5 (4,6)
– в том числе КОС	14 (11,9)	12 (11,0)	55 (50,5)
<i>Corynebacterium spp.</i>	10 (8,5)	6 (5,5)	8 (7,7)
<i>Stomatococcus spp.</i>	27 (22,9)	39 (35,8)	0
<i>Грам- бактерии</i>	84 изолята	60 изолятов	2 изолята
<i>Neisseria spp.</i>	28 (23,7)	46 (42,2)	1 (0,9)
<i>Haemophilus spp.</i>	3 (2,5)	1 (0,9)	0
<i>Moraxella spp.</i>	6 (5,1)	4 (3,7)	0
Представители сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	29 (24,6)	6 (5,5)	0
НГОБ	21 (17,8)	4 (3,7)	1 (0,9)
– в том числе <i>Pseudomonas aeruginosae</i>	6 (5,1)	2 (1,8)	0
<i>Candida spp.</i>	43 (36,4)	29 (26,6)	0
<i>Микрофлора не выделена</i>	18 (15,3)	18 (16,5)	42 (38,5)

бронхиальной обструкции (таблица 22). У больных с ОФВ₁≥50% должно в 5,3 раз чаще выделялись коагулаза-негативные стафилококки. А у пациентов более старшего возраста, имевших ограничение скорости воздушного потока степени GOLD III – IV, чаще высевалась грамотрицательная микрофлора: представители

семейства энтеробактерий и неферментирующих бактерий (хотя различий по частоте выявления отдельных видов, включая *Pseudomonas aeruginosae*, не было), также наблюдалась тенденция к более частому обнаружению пневмококков.

Таблица 22

Частота выделения микроорганизмов из нижних дыхательных путей больных ХОБЛ в зависимости от степени бронхиальной обструкции (количество (%) больных)

Степень бронхообструкции	ОФВ ₁ ≥ 50% должного	ОФВ ₁ < 50% должного	р
Количество больных, возраст, М±SD	63 больных	55 больных	
Микроорганизмы	58,6 ± 11,2 лет	63,0 ± 11,3 лет	0,036
<i>Грам+ бактерии</i>			
α-гемолитические стрептококки	51 (81,0)	41 (74,5)	0,395
β-гемолитические стрептококки	10 (15,9)	9 (16,3)	0,951
<i>S. pneumoniae</i>	2 (3,2)	6 (10,9)	0,09
<i>Staphylococcus spp.</i>	19 (30,2)	7 (12,7)	0,022
– в т.ч. <i>S. aureus</i>	7 (11,1)	5 (9,1)	0,719
– в т.ч. КОС	12 (19,1)	2 (3,6)	0,009
<i>Corynebacterium spp.</i>	4 (6,3)	6 (10,9)	0,373
<i>Stomatococcus spp.</i>	11 (17,5)	16 (29,0)	0,138
<i>Грам- бактерии</i>			
<i>Neisseria spp.</i>	13 (20,6)	15 (27,2)	0,401
<i>Haemophilus spp.</i>	2 (3,2)	1 (1,8)	0,632
<i>Moraxella spp.</i>	3 (4,8)	3 (5,5)	0,863
Представители сем. Enterobacteriaceae	10 (15,9)	19 (34,5)	0,019
НГОБ	6 (9,5)	15 (27,3)	<0,0001
– в т.ч. <i>P. aeruginosae</i>	2 (3,2)	4 (7,3)	0,313
<i>Candida spp.</i>	21 (33,3)	22 (40,0)	0,451
Микробные ассоциации (≥ 3 видов)	12 (19,0)	22 (40,0)	0,012
Количество видов микроорганизмов в мокроте, М±SD	2,2±1,4	3,1±1,5	0,01

Энтеробактерии преобладали также и в количественном отношении у больных с низкими спирометрическими показателями. Обсемененность энтеробактериями у больных с ОФВ₁<50% должного составила lg4 [lg3;lg6] КОЕ/мл, а у больных с ОФВ₁≥50% должного – lg3 [lg2;lg4] КОЕ/мл, различия

достоверны при $p=0,029$. Достоверных различий по количеству других видов микроорганизмов не было. Полученные данные согласуются и с результатами других исследователей [71, 317, 381]. Кроме того, у больных с низким $ОФВ_1$ в 2 раза чаще выделялись микробные ассоциации, состоящие из 3-х и более возбудителей, а среднее количество видов микроорганизмов в мокроте было в 1,4 больше, чем у больных с $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного.

Следует отметить достаточно высокий процент обнаружения грибов рода *Candida* (36,4%) в бронхиальном содержимом больных ХОБЛ. Содержание *Candida spp.* у этих больных составило $lg3 [lg2; lg4]$ КОЕ/мл. В ходе дальнейшего анализа было установлено, что выявление кандид в отделяемом НДП ассоциировано преимущественно с пожилым возрастом, приемом системных глюкокортикостероидов, высокой кумулятивной дозой преднизолона (более 800 мг в течение года), а также с наличием сопутствующего сахарного диабета (таблица 23). Различия по использованию ингаляционных кортикостероидов и сопутствующей сердечно-сосудистой патологии между больными с кандидозом и остальными пациентами находились в пределах статистической тенденции. Грибковая кандидозная флора в 86% случаев выделялась в ассоциации с 1 – 5 другими видами микроорганизмов; при этом количество видов микроорганизмов, высеянных у больных с грибковой флорой, было в 1,6 раз больше, чем у остальных пациентов.

В большинстве случаев у больных ХОБЛ одновременно с мокротой/БАЛ исследовали микрофлору слизистых зева и носа. Микробиоценоз верхних дыхательных путей, особенно зева, включает большое разнообразие видов бактерий. В состав нормальной микрофлоры зева обычно входят α -гемолитические стрептококки в количестве $lg4 - lg5$ КОЕ/тампон, сапрофитные нейссерии, также негемолитические и β -гемолитические стрептококки (за исключением пиогенных) до $lg3 - lg4$ КОЕ/тампон, возможно присутствие коринеформных бактерий до $lg3$ КОЕ/тампон и УПБ до $lg2$ КОЕ/тампон [64]. Со слизистой носа в норме можно выделить условно-патогенные микроорганизмы в концентрации $lg1 - lg3$

КОЕ/тампон. Появление УПБ в количестве $1g_4$ КОЕ/тампон и выше свидетельствует о выраженном дисбиозе слизистых и возможной инфекции.

Данные исследования микрофлоры носа и зева представлены в таблице 21. У 42 больных ХОБЛ (38,5%) микрофлора со слизистой носа не высевалась, у остальных пациентов она была представлена, в основном, коагулаза-негативными стафилококками (КОС) в диагностически незначимых количествах ($1g_3$ КОЕ/тампон и менее). Только у 21 больного ХОБЛ со слизистой носа был выделен *S. epidermidis* в концентрации $1g_4 - 1g_6$ КОЕ/тампон. В единичных случаях со слизистой носа высевались *Corynebacterium pseudodiphthericum*, *S.aureus*, α - и β -гемолитические стрептококки, нейссерии, *S.pneumoniae*, *Acinetobacter lwoffii*.

Таблица 23

Характеристики больных в зависимости от выявления в мокроте грибов рода *Candida* ($M \pm SD$; количество (%) больных)

Выделение <i>Candida spp.</i>	<i>Candida</i> +	<i>Candida</i> -	p
Количество больных	43 больных	75 больных	
Характеристики			
Возраст, лет	64,4 \pm 10,6	59,8 \pm 11,9	0,04
Длительность заболевания, лет	17,1 \pm 11,3	17,1 \pm 12,1	0,99
Индекс курения, пачка-лет	39,9 \pm 15,2	34,3 \pm 7,7	0,21
ОФВ ₁ , % должного	60,3 \pm 30,9	63,8 \pm 26,4	0,64
Микробные ассоциации	37 (86,0)	46 (61,3)	0,0047
Количество видов микроорганизмов в мокроте	3,27 \pm 1,45	2,06 \pm 1,17	0,0003
Прием системных ГКС	30 (69,8)	30 (40)	0,0018
Суммарная доза преднизолона (за год) \geq 800 мг	22 (51,2)	22 (29,3)	0,026
Использование ингаляционных ГКС	30 (69,8)	35 (46,7)	0,079
Количество курсов антибактериальной терапии	1,07 \pm 0,62	0,94 \pm 0,56	0,540
Сопутствующая патология			
Сахарный диабет	25 (58,1)	25 (33,3)	0,009
Ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертония	28 (65,1)	36 (48)	0,075

Микрофлора зева у всех больных была представлена большим количеством разных видов стрептококков, часто – сапрофитными нейссериями и стоматококками, и в единичных случаях – гемофильными палочками, дифтероидами, стафилококками, моракселлами, энтеробактериями и НГОБ.

Энтеробактерии и НГОБ в мокроте/БАЛ встречались примерно в 4 раза чаще, чем на слизистой зева (24,6% и 17,8% против 5,5% и 3,7%, соответственно), разница достоверна при $p < 0,001$. Частота выделения других патогенов со слизистой зева и из отделяемого бронхов была сопоставимой, за исключением нейссерий, которые встречались в 1,8 раз чаще на слизистой зева (42,2% против 23,7%, разница достоверна при $p < 0,01$), и пневмококков, которые на слизистой зева не были обнаружены.

Наблюдались изменения состава микрофлоры по мере продвижения от верхних отделов дыхательных путей к нижним. Удельный вес грамположительной микрофлоры был максимальным на слизистой носа и уменьшался по направлению к нижним отделам респираторного тракта, преимущественно, за счет грамположительных кокков, которые в мазках со слизистой носа встречались в 86,5% случаев всей выделенной микрофлоры, со слизистой зева – в 63,2% случаев, в отделяемом бронхов – в 55,1% случаев. Доля дифтероидов составляла 10,8% на слизистой носа, 2,3% - на слизистой зева и 3,2% - в мокроте; гемофильная палочка встречалась в единичных случаях во всех локусах. Частота выделения грамотрицательных микроорганизмов, напротив, нарастала при продвижении вниз: энтеробактерии совместно с НГОБ в отделяемом из носа высевались в 1,4% среди всех полученных культур, из зева – в 4,6%, из мокроты – в 16,0%. Доля сапрофитных нейссерий была максимальна на слизистой зева (17,6%), что соответствует современным представлениям о нормальном аэробном микробиоценозе ротоглотки; на слизистых носа и бронхов они выявлялись реже (в 1,4% и 8,9% соответственно). Моракселлы во всех отделах респираторного тракта встречались в единичных случаях. Также отмечено увеличение удельного веса дрожжеподобных грибов по направлению от верхних к нижним дыхательным путям. Грибы рода *Candida* не встречались в мазках из носа, в 26,6% случаев обнаруживались в мазках из зева и в 36,4% случаев – в мокроте.

Из полученных данных видно, что в составе микробиоценоза НДП больных ХОБЛ часто присутствовали микроорганизмы, выделяемые со слизистой зева. Были проанализированы случаи выделения одних и тех же микроорганизмов

одновременно из мокроты/БАЛ и со слизистой ВДП, результаты представлены в таблице 24.

Таблица 24

Частота совпадений при выделении отдельных групп микроорганизмов из отделяемого бронхов и со слизистых ВДП больных ХОБЛ (количество (%) больных)

Источник	Мокрота/БАЛ – Зев	Мокрота/БАЛ – Нос
Количество больных	109 больных	104 больных
Бактерии		
α-гемолитические стрептококки	78 (71,6)	1 (1,0)
β-гемолитические стрептококки	7 (6,4)	-
<i>S. pneumoniae</i>	-	1 (1,0)
<i>Haemophilus spp.</i>	1 (0,9)	-
<i>Moraxella spp.</i>	1 (0,9)	-
<i>Neisseria spp.</i>	21 (19,3)	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	6 (5,5)	2 (1,9)
<i>Candida spp.</i>	20 (18,3)	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 (3,7)	4 (3,8)
КОС	2 (1,8)	6 (5,8)
НГОб	4 (3,7)	-
сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	4 (3,7)	-
<i>Stomatococcus spp.</i>	19 (17,4)	-

Сходство микробного пейзажа НДП и зева по 1 – 4 видам микроорганизмов наблюдалось у 89 из 109 больных (81,7%), тогда как сходство микрофлоры слизистой носа и отделяемого бронхов было выявлено только у 8 больных ХОБЛ (7,7%) для 1 – 2 видов бактерий. Наибольшее число совпадений по выделению со слизистой зева и из отделяемого бронхов отмечалось для α-гемолитических стрептококков, абсолютное большинство из которых относилось к виду *S. oralis/mitis* 1. Случаи выделения одних и тех же видов микроорганизмов из мокроты/БАЛ и со слизистой носа были единичными и преимущественно касались стафилококков.

Таким образом, изучение микробного пейзажа слизистых оболочек дыхательных путей показало, что при ХОБЛ роль патогенов часто играют

микроорганизмы, вегетирующие на слизистой ротоглотки, о чем свидетельствует большой процент совпадений между микрофлорой зева и бронхиального дерева, касающийся, в основном, α -гемолитических стрептококков. Распространение возбудителей по дыхательным путям может быть связано с нарушением функционирования защитных систем макроорганизма, включая ухудшение мукоцилиарного клиренса, угнетение клеточного и гуморального звеньев иммунитета, ослабление местного иммунного статуса – IgA, лизоцима, лактоферрина и т.д. Длительное воздействие табакокурения и вызванный им оксидативный стресс, повторные курсы антибактериальной и гормональной терапии, наличие сопутствующей патологии способствуют ослаблению неспецифического и адаптационного иммунитета у больных ХОБЛ. Маркером иммунодефицита у обследованных нами пациентов является частое обнаружение грибковой кандидозной флоры. Другим фактором, облегчающим колонизацию респираторного тракта, может быть увеличение персистентного потенциала патогенов или условно-патогенных микроорганизмов при формировании патобиоценоза и бактерионосительства [71]. Этиологическая роль грамотрицательной микрофлоры (энтеробактерий и НГОб) нарастала по мере продвижения от верхних к нижним дыхательным путям. Выявление Грам-негативных микроорганизмов, чаще в составе микробных ассоциаций, было связано с пожилым возрастом и выраженными бронхообструктивными нарушениями.

4.2. Определение антибиотикорезистентности выделенных бактерий

Чувствительность к антибактериальным препаратам была изучена у условно-патогенных бактерий, выделенных в диагностически значимых количествах (из мокроты – более 10^6 КОЕ/мл, из БАЛ – более 10^2 КОЕ/мл, со слизистой носа и зева – более 10^4 КОЕ/тампон). Исследованные изоляты из НДП обладали высокой резистентностью к ампициллину (кроме дифтероидов и нейссерий), к эритромицину (за исключением *S.aureus* и стоматokokков), к тетрациклину, линкозамидам (рисунок 6). Резистентность к антибиотикам пенициллинового ряда

была обнаружена у 33,3% штаммов пневмококков, полученных из мокроты и БАЛ. Резистентность к аминогликозидам среди НГОБ и гемофильных палочек из НДП составляла соответственно 42,4% и 75%. Высокую чувствительность к цефалоспорином 1-го и 3-го поколений сохраняли нейссерии, дифтероиды, стафилококки. К левомецетину были чувствительны β -гемолитические стрептококки, моракселлы, коринебактерии, энтеробактерии. Все исследованные культуры из НДП обладали чувствительностью к моксифлоксацину и проявляли резистентность к ципрофлоксацину (кроме дифтероидов и энтеробактерий). К меропенему все исследованные штаммы были чувствительны.

У штаммов, полученных из разных отделов респираторного тракта, чувствительность к антибиотикам, в основном, совпадала. Исключение составляли штаммы КОС, выделенные со слизистых носа и зева, с более высокой резистентностью к аминогликозидам по сравнению с культурами из мокроты и БАЛ (38,9% и 14,3% соответственно, $p < 0,05$). Также резистентность к цефалоспорином 3-го поколения была выше у энтеробактерий из ВДП, чем у культур из НДП (33,3% и 7,7% культур, соответственно, $p < 0,05$).

Среди грибов рода *Candida* чувствительность к нистатину проявляли 96,5%, к клотримазолу – 91,2%, к амфотерицину В – 71,7%, к триазолам (флуконазол или итраконазол) – 8,8% выделенных культур.

Часто встречались полирезистентные штаммы бактерий, которые проявляли устойчивость к двум и более антибиотикам. Полирезистентными были 50% β -гемолитических стрептококков, 75% пневмококков, все выделенные штаммы гемофильных палочек, 42,1% дифтероидов, 31 % *S.aureus*, 81,3% КОС, 93,9% НГОБ, 64% энтеробактерий. Среди представителей нормальной микрофлоры ротоглотки, колонизировавших нижние дыхательные пути, полирезистентностью обладали 80,8% α -гемолитических стрептококков, 85,7% стоматokokков и 59,1% нейссерий. Полирезистентные штаммы встречались в 2 раза чаще у больных ХОБЛ с $ОФВ_1 < 50\%$ должного по сравнению с больными, имеющими $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного (в 29,9% и 14,5% случаев, соответственно; различия достоверны при $p = 0,032$).

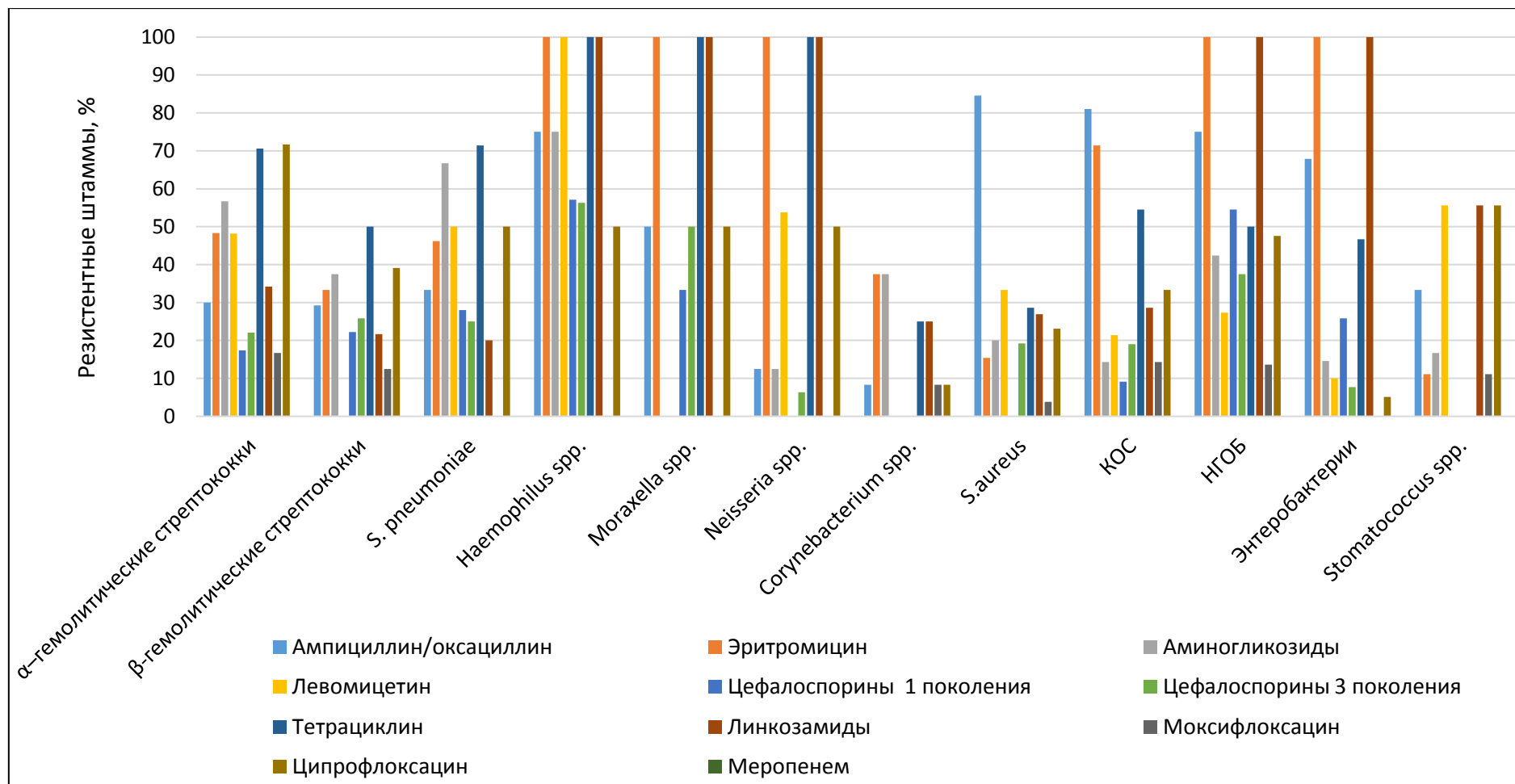


Рисунок 6. Резистентность бактерий, выделенных из нижних дыхательных путей, к антибиотикам

4.3. Определение факторов патогенности и персистенции выделенных бактерий

Биологические характеристики микроорганизмов (адгезивные, инвазивные свойства, факторы защиты от иммунного ответа хозяина) способствуют успешной бактериальной колонизации [13]. В связи с этим у культур условно-патогенных микроорганизмов – стафилококков, энтеробактерий и НГОб, выделенных со слизистых верхних и нижних дыхательных путей больных ХОБЛ, был определен комплекс свойств, обеспечивающий их патогенный и персистентный потенциал.

Адгезивные свойства оппортунистической микрофлоры могут рассматриваться в качестве фактора патогенности, так как они позволяют микробам закрепиться на поверхности слизистых и колонизировать соответствующий биотоп, достигая определенного популяционного уровня [46]. Ранее было установлено, что гемагглютинирующая активность микроорганизмов коррелирует со степенью их адгезии к клеткам буккального эпителия [94] и таким образом характеризует адгезивные свойства бактерий. В связи с этим у 46 культур микроорганизмов, выделенных от больных ХОБЛ, была изучена способность к гемагглютинации. Гемагглютинационную активность проявляли только 5 из 16 штаммов золотистого стафилококка, 3 из 18 штаммов семейства энтеробактерий и 1 из 7 культур синегнойной палочки, в разных титрах – от агглютинации в исходной суспензии (без разведения) у *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* и *Enterobacter cloacae* до титра 1:128 у штамма *Enterobacter cloacae*. Из 11 изученных культур коагулаза-негативных стафилококков ни одна не обладала способностью к гемагглютинации.

Был проведен анализ адгезивных свойств микроорганизмов с учетом характеристик больных ХОБЛ. Культуры УПБ, выделенные от больных с I степенью тяжести ХОБЛ, проявляли способность к гемагглютинации в 9,1% случаев (1 из 11 штаммов), от больных со II степенью – в 16,7% случаев (3 из 18 штаммов), с III степенью – в 23,1% случаев (3 из 13 штаммов), с IV степенью – в 50% случаев (2 из 4 штаммов), однако, достоверности различий не было ($p_{\text{ода}}=0,29$). Также не было обнаружено положительных взаимосвязей между

гемагглютинирующей способностью бактерий и интенсивностью колонизации нижних дыхательных путей ($r=0,18$; $p=0,22$). Напротив, содержание в мокроте культур, проявлявших агглютинирующую способность в титре, превышающем 1:32, в среднем, составило $2,33 \pm 0,58$ lg КОЕ/мл, в то время как количество культур с низкими адгезивными свойствами, было достоверно выше и составляло $4,14 \pm 1,97$ lg КОЕ/мл ($p=0,045$). Была выявлена отрицательная корреляционная связь между интенсивностью гемагглютинации, которая оценивалась с учетом титра реакции, и бактериальной обсемененностью ($r=-0,79$; $p=0,012$). Таким образом, только 19,6% исследованных культур условно-патогенных бактерий проявляли гемагглютинирующие свойства, не влиявшие на степень бактериальной обсемененности НДП у больных ХОБЛ. Эти данные находят подтверждение и в работах других авторов, которые также не обнаружили корреляции между адгезивной активностью (оцениваемой в реакции гемагглютинации) и количеством УПБ в кишечнике у ВИЧ-инфицированных детей, несмотря на наличие таких взаимосвязей для доминирующей индигенной флоры [46]. Это позволяет предполагать, что у оппортунистической микрофлоры, заселяющей слизистые дыхательных путей при ХОБЛ, способность к гемагглютинации не является основным механизмом, обеспечивающим бактериальную колонизацию и существуют другие факторы, ответственные за формирование популяционного уровня.

Одним из важных механизмов выживания бактерий на поверхности органов и тканей является их способность к образованию структурированных ассоциаций, известных под термином «биопленки». Микроорганизмы в составе биопленок характеризуются высокой устойчивостью к антибактериальным препаратам и экстремальным воздействиям среды [140]. Способность к формированию биопленки на поверхности полистеролового планшета была изучена у 43 культур, выделенных из НДП и 12 культур, выделенных из ВДП больных ХОБЛ. Результаты представлены на рисунке 7 и в таблице 25. Наиболее высокую способность к формированию биопленки проявили культуры НГОБ и КОС, среди тех и других половина штаммов показала высокую степень адгезии к полистеролу ($>1,0$ ед. ОП).

Для большинства *S.aureus* (57,9%) были характерны показатели $ОП \geq 0,5$ ед. Более половины энтеробактерий (55,0%) проявили низкую способность к образованию биопленок.

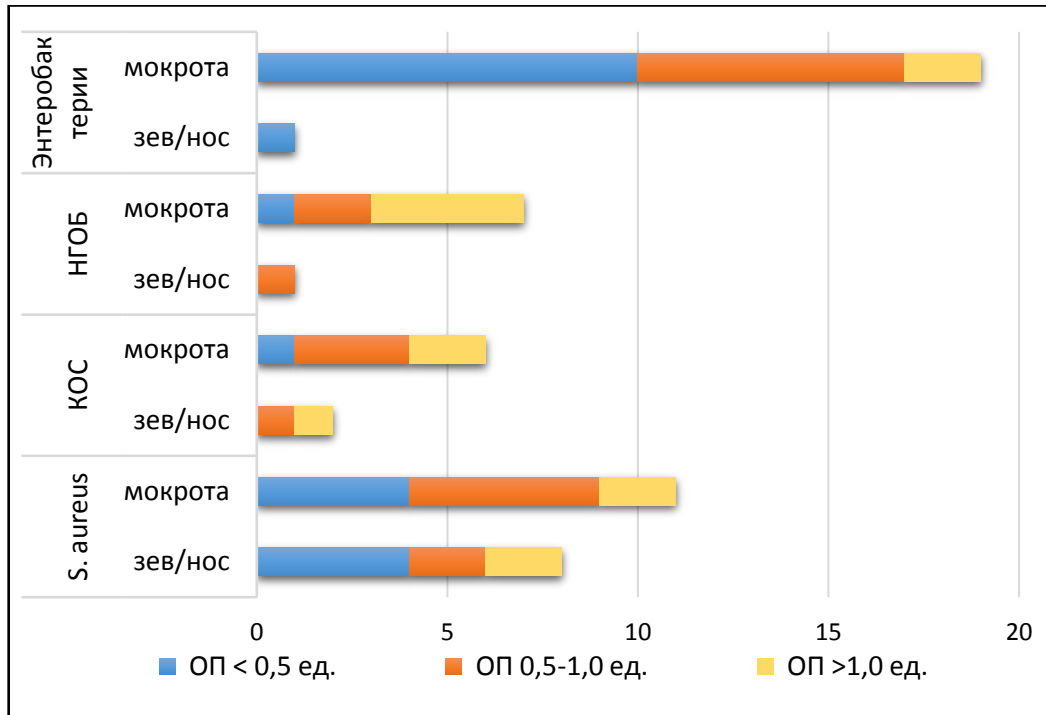


Рисунок 7. Распределение бактерий по способности к образованию биопленки на поверхности полистиролового планшета

Также и средние значения ОП у энтеробактерий были достоверно ниже, чем у НГОБ и КОС; однако различий между культурами, выделенными от больных ХОБЛ с разными фенотипами и разной степенью тяжести, не было.

Таблица 25

Способность бактерий, выделенных из дыхательных путей больных ХОБЛ, к образованию биопленки на поверхности полистиролового планшета

Бактерии	Число штаммов	Средняя ОП, ед., $M \pm SD$	p
<i>S. aureus</i>	19	0,63±0,34	$p_{ода} = 0,02$ $p_{S.aureus-КОС} = 0,16$ $p_{S.aureus-НГОБ} = 0,09$ $p_{S.aureus-Энтеробактерии} = 0,11$ $p_{КОС-НГОБ} = 0,55$ $p_{КОС-Энтеробактерии} = 0,015$ $p_{НГОБ-Энтеробактерии} = 0,011$
КОС	8	0,81±0,11	
НГОБ	8	0,92±0,53	
Энтеробактерии	20	0,44±0,39	

Для оценки инвазивных свойств микроорганизмов были определены лизоцимная и протеолитическая активность у 48 выделенных культур бактерий (15

штаммов *S.aureus*, 11 штаммов КОС, 4 штаммов синегнойной палочки и 18 штаммов энтеробактерий). Лизоцимная активность (ЛА) коррелирует с вирулентными свойствами условно-патогенных микроорганизмов, создавая селективные преимущества для патогенов в экологической нише [62, 88]. В настоящем исследовании ЛА в качественном тесте проявляли все исследованные штаммы *S.aureus* и *P.aeruginosa*, что говорит о высокой агрессивности этих бактерий. Среди изученных культур КОС и энтеробактерий ни одна не показала наличия ЛА. Среди культур, выделенных от больных ХОБЛ I степени тяжести, ЛА обладали 4 из 11 штаммов (36,4%), при ХОБЛ II степени тяжести – 9 из 19 штаммов (47,4%), при ХОБЛ III степени тяжести – 4 из 14 штаммов (28,6%), ХОБЛ IV степени тяжести – 1 из 4 штаммов (25%). Различий по ЛА выделенных бактерий в зависимости от степени тяжести или фенотипа ХОБЛ не обнаружено.

Протеолитическую активность определяли качественным и количественным методом у культур микроорганизмов, выделенных из верхних и нижних дыхательных путей. В качественном тесте ПА по гидролизу казеина проявили 2 *Enterobacter spp.* и 1 *Serratia spp.* из 18 штаммов энтеробактерий (16,7%), 1 из 15 штаммов *S. aureus* (6,7%) и 5 из 11 штаммов КОС (45,5%), а также все исследованные культуры НГОБ (4 штамма *P.aeruginosa*). Таким образом, среди исследованных групп микроорганизмов ПА была наиболее характерна для штаммов синегнойной палочки ($p=0,0002$ против *S.aureus*; $p=0,001$ против энтеробактерий; $p=0,057$ против КОС). Среди КОС ПА-положительные изоляты встречались чаще, чем у культур золотистого стафилококка ($p=0,02$); также отмечена тенденция при сравнении КОС и энтеробактерий ($p=0,09$). Достоверных различий по ПА в качественном тесте между больными ХОБЛ с разной степенью тяжести и разными фенотипами не было выявлено.

У 29 культур бактерий при выращивании на целлофановой мембране был получен пул внеклеточных белков и определена внеклеточная ПА количественным методом по расщеплению двух субстратов. Данные представлены в таблице 26. Активность по расщеплению гемоглобина и казеина выявлялась у стафилококков, соответственно, в 70,6% и 58,8% случаев; у энтеробактерий – в 45,5% и 27,3%.

Следует отметить, что ПА в количественном тесте обнаруживалась значительно чаще, чем в качественном. Очевидно, количественное определение ПА по гидролизу разных белковых субстратов является более чувствительным методом, чем качественная реакция. Кроме того, половина штаммов *Staphylococcus spp.* (47,1%) и лишь десятая часть энтеробактерий (9,1%) гидролизировали оба субстрата (различия достоверны при $p=0,035$). Это может свидетельствовать о наличии у данных культур комплекса ферментов с различной специфичностью, что усиливает их инвазивные и патогенные свойства. Исследованная культура *P.aeruginosa* обладала активностью по расщеплению обоих субстратов. Средние значения ПА по гидролизу гемоглобина у культур стафилококков были достоверно выше, чем у энтеробактерий ($p=0,048$). Исследование ПА у бактерий, выделенных от больных с разными вариантами течения ХОБЛ, не выявило достоверных различий по гидролизу казеина и гемоглобина.

Таблица 26

Протеолитическая активность бактерий, выделенных от больных ХОБЛ

Бактерии	Число штаммов	ПА на гемоглобине		ПА на казеине	
		Число (%) ПА ⁺ штаммов	Средняя ПА, е.а./мл	Число (%) ПА ⁺ штаммов	Средняя ПА, е.а./мл
<i>Staphylococcus spp.</i>	17	12 (70,6)	9,8± 9,1	10 (58,8)	20,0±13,9
сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	11	5 (45,5)	3,7±4,2	3 (27,3)	13,5±14,6
НГОБ	1	1 (100,0)	29,9	1 (100,0)	45,1
<i>P Staphylococcus spp.- Enterobacteriaceae</i>		$p=0,048$		$p=0,24$	

Микроорганизмы обладают также факторами защиты от систем неспецифического и специфического иммунитета хозяина, способствующими длительному выживанию бактерий на слизистых оболочках дыхательных путей при хронических респираторных заболеваниях. К таким биологическим свойствам бактерий относятся антилизоцимная, антилактоферриновая и антииммуноглобулиновая активности, которые были определены у изолятов, выделенных от больных ХОБЛ.

Антилизоцимная активность направлена на подавление мощного фактора врожденного иммунитета – лизоцима, и является важным маркером

персистирующей активности микроорганизмов, облегчающим бактериальную колонизацию дыхательных путей. По данным литературы значения АЛА выше 2 мкг/мл характеризуют высокий патогенный потенциал бактерий, а значения АЛА у возбудителей ниже 2 мкг/мл обычно ассоциируются с более благоприятным течением заболевания [19]. Антилизозимная активность была определена у 78 изолятов бактерий, выделенных из верхних и нижних дыхательных путей больных ХОБЛ. Частота встречаемости АЛА-позитивных штаммов и уровни АЛА представлены в таблице 27.

Таблица 27

Антилизозимная активность бактерий, выделенных при ХОБЛ

Бактерии	Источник выделения	Число штаммов	Число (%) АЛА ⁺ штаммов	Уровень АЛА (мкг/мл*ед.ОП) М±SD
Staphylococcus spp. (1)	<i>Бронхи</i>	21	14 (66,7%)	4,34±4,10
	<i>Зев</i>	5	3 (60,0%)	2,10±2,99
	<i>Нос</i>	12	9 (75,0%)	3,05±2,66
	<i>Все источники</i>	38	26 (68,4%)	3,64±3,59
Семейство Enterobacteriaceae (2)	<i>Бронхи</i>	28	24 85,7%	4,74±4,51
	<i>Зев</i>	3	2 (66,7%)	1,62±2,00
	<i>Нос</i>	0	-	-
	<i>Все источники</i>	31	26 (83,9%)	4,43±4,41
НГОБ (3)	<i>Бронхи</i>	7	3 (42,9%)	1,91±4,25
	<i>Зев</i>	1	0	0
	<i>Нос</i>	1	0	0
	<i>Все источники</i>	9	3 (33,3%)	1,49±3,77
p (все источники)			p ₁₋₂ = 0,14; p ₁₋₃ = 0,052; p ₂₋₃ = 0,003	p _{ода} = 0,15 p ₁₋₂ = 0,48; p ₁₋₃ = 0,052; p ₂₋₃ = 0,008

Группы бактерий различались между собой по этим показателям: наименьшая активность наблюдалась у штаммов НГОБ, для которых было характерно достоверное снижение как частоты выявления АЛА-позитивных штаммов, так и средних значений активности по сравнению с энтеробактериями и тенденция к снижению по сравнению со стафилококками. Среди штаммов, полученных из

отделяемого бронхов, АЛА чаще всего обнаруживалась у энтеробактерий (различия достоверны по сравнению с НГОБ при $p=0,016$). Распределение бактерий разных групп по уровням АЛА представлено в таблице 28. Среди культур, выделенных из мокроты, высокую активность (> 2 мкг/мл*ед.ОП) проявляли 63,6% *S.aureus*, 70% КОС, 67,9% энтеробактерий, и только 14,3% НГОБ (различия частот между НГОБ и другими группами бактерий достоверны при $p<0,05$). Среди штаммов со слизистых носа и ротоглотки высокая АЛА была характерна для 44,4% *S.aureus*, 62,5% КОС и $\frac{1}{3}$ энтеробактерий, оба штамма НГОБ были АЛА-негативными (различия между группами бактерий недостоверны).

Таким образом, только для НГОБ было характерно полное отсутствие или низкая АЛА (в 88,9% случаев), что отличало их от других исследованных бактерий (различия частот между группами бактерий достоверны при $p<0,01$); а 60,5% стафилококков и 64,5% энтеробактерий отличались высоким или очень высоким уровнем АЛА, что может свидетельствовать о значительном персистентном потенциале этих микроорганизмов.

Также была проанализирована частота встречаемости АЛА-позитивных штаммов и уровень активности у стафилококков, энтеробактерий и НГОБ, выделенных из разных источников (таблица 28). В целом, АЛА отсутствовала у 25,0% культур, полученных из НДП, и у 40,9% штаммов, выделенных со слизистых зева и носа (различия недостоверны, $p=0,17$). Однако, АЛА-позитивные штаммы из разных отделов респираторного тракта различались по уровню активности: очень высокие значения АЛА (более 4 мкг/мл*ед.ОП) встречались у 76,9% культур из НДП и только у 35,7% изолятов со слизистых зева и носа ($p=0,005$). Среднее значение АЛА у культур из отделяемого бронхов ($3,63\pm 4,09$ мкг/мл*ед.ОП) тоже было в 1,8 раз выше, чем у изолятов со слизистых ВДП ($1,98\pm 2,14$ мкг/мл*ед.ОП, $p=0,04$). Были проанализированы связи между продукцией лизоцима и АЛА у бактерий, выделенных из разных источников. У возбудителей из ВДП выявлена отрицательная корреляционная связь между значениями ЛА и АЛА ($r= -0,74$; $p=0,009$). Известно, что АЛА формируется под действием лизоцима, вырабатываемого как другими УПБ, так и самим бактериальным агентом [88]. С

другой стороны, продукция и эффекты лизоцима контролируются АЛА бактерий. Обнаруженная корреляция свидетельствует о существовании определенного равновесия в системе ЛА – АЛА у УПБ, персистирующих на слизистых зева и носа. Бактерии, полученные из отделяемого бронхов больных ХОБЛ, проявляли более высокий уровень АЛА по сравнению с культурами из ВДП, однако, это не сопровождалось снижением уровня ЛА вследствие утраты регуляторных связей между данными активностями. Полученные результаты могут указывать на дисбаланс в системе ЛА – АЛА у штаммов, выделенных из очага воспалительного процесса, способствующий усилению их персистентного потенциала.

Таблица 28

Распределение бактерий, выделенных из верхних и нижних дыхательных путей больных ХОБЛ, по уровням антилизозимной активности

Бактерии		Источник выделения	Число штаммов			
			Уровень АЛА, мкг/мл*ед.ОП			
			0	<2	2 – 4	>4
Стафилококки	Staphylococcus aureus	бронхи	4	0	2	5
		зев/нос	4	1	3	1
	КОС	бронхи	3	0	3	4
		зев/нос	1	2	1	4
Семейство энтеробактерий	Enterobacter spp.	бронхи	1	3	1	8
		зев/нос	0	1	0	0
	Klebsiella spp.	бронхи	1	1	2	2
		зев/нос	-	-	-	-
	Другие (Citrobacter spp., Serratia spp., Escherichia coli, Proteus mirabilis)	бронхи	2	1	2	4
		зев/нос	1	0	1	0
НГОБ	Pseudomonas aeruginosa	бронхи	0	2	0	1
		зев/нос	1	0	0	0
	Acinetobacter spp., Flavobacterium spp.	бронхи	4	0	0	0
		зев/нос	1	0	0	0

Также была проанализирована АЛА у бактериальных культур, выделенных от больных ХОБЛ разной степени тяжести (таблица 29).

Антилизоцимная активность бактерий, выделенных при различных степенях тяжести ХОБЛ (M±SD)

Бактерии		Стафилококки			Энтеробактерии			НГОБ		
Степень тяжести ХОБЛ	Источник выделения	Кол-во штаммов	Кол-во АЛА ⁺ штаммов	Уровень АЛА, мкг/мл*ед. ОП	Кол-во штаммов	Кол-во АЛА ⁺ штаммов	Уровень АЛА, мкг/мл*ед. ОП	Кол-во штаммов	Кол-во АЛА ⁺ штаммов	Уровень АЛА, мкг/мл*ед. ОП
GOLD I	НДП	2	1	2,82± 2,81	4	2	3,10± 3,59	0	-	-
	ВДП	5	4		0	-		0	-	
GOLD II	НДП	11	6	2,15± 2,77	9	7	3,73± 3,11	3	1	0,34± 0,58
	ВДП	9	5		1	1		0	-	
GOLD III	НДП	5	5	6,44± 3,04	14	14	4,33± 4,07	4	2	2,06± 4,63
	ВДП	2	2		2	1		2	0	
GOLD IV	НДП	3	3	7,63± 4,45	1	1	18,52	0	-	-
	ВДП	1	1		0	-		0	-	
p ода для значений АЛА		0,001			0,002			-		

Согласно представленным данным, наблюдалась следующая закономерность: штаммы энтеробактерий, выделенные из верхних и нижних дыхательных путей больных ХОБЛ I, II, III, IV степени тяжести, проявляли АЛА в 50%, 80%, 93,8% и 100% случаев, соответственно. Среди всех стафилококков частота выявления АЛА-позитивных штаммов, выделенных при ХОБЛ I и II степени тяжести, составляла 71% и 50% соответственно, в то время как при ХОБЛ III и IV степени уже все культуры проявляли активность в отношении лизоцима. При учете всех видов возбудителей АЛА проявляли 59,1% культур, полученных от больных I-II степени тяжести, и 85,3% штаммов, выделенных при III-IV степени ХОБЛ (различия достоверны $p=0,01$), хотя для отдельных видов возбудителей различия находились лишь в пределах статистической тенденции ($p=0,09$ для энтеробактерий и $p=0,08$ для стафилококков). Распределение бактерий по уровням активности при разных степенях тяжести ХОБЛ представлено на рисунке 8.

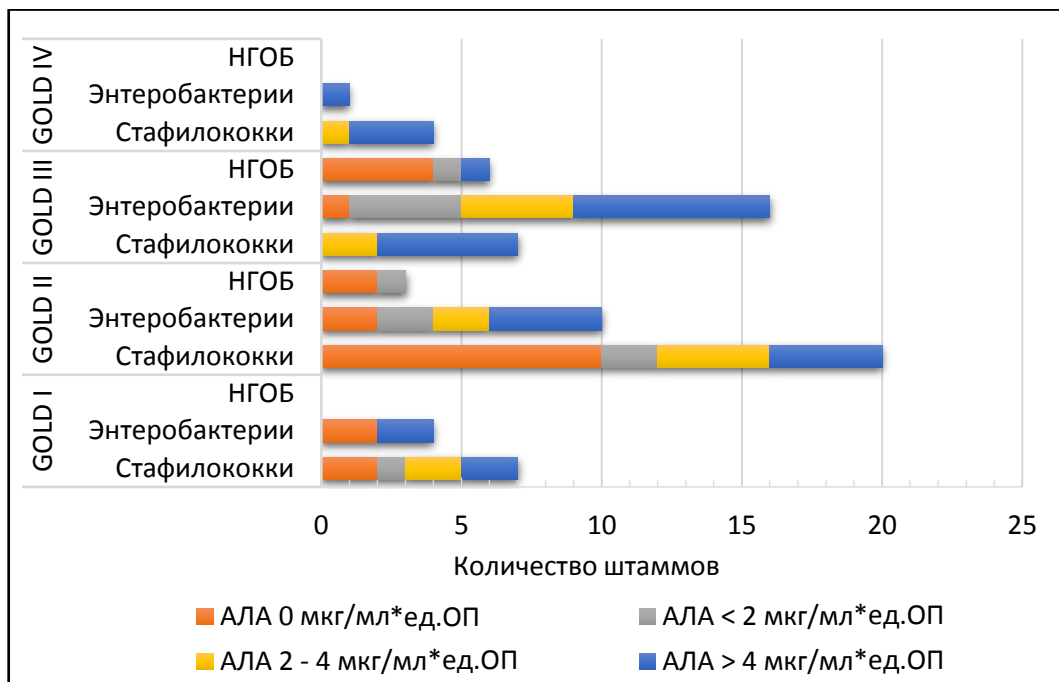


Рисунок 8. Распределение бактерий, выделенных при разных степенях тяжести ХОБЛ, по уровню антилизосимной активности

У 54,5% культур, выделенных от больных ХОБЛ с $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного, активность отсутствовала или проявлялась на низком уровне (< 2 мкг/мл*ед.ОП), в то время как при $ОФВ_1 < 50\%$ должного 70% выделенных культур обладали высокой, а 61,8% – очень высокой АЛА (> 4 мкг/мл*ед.ОП), различия частот между группами

больных ХОБЛ достоверны ($p=0,027$ для АЛА >2 мкг/мл*ед.ОП и $p=0,026$ для АЛА >4 мкг/мл*ед.ОП). Также различались средние значения АЛА всех штаммов, выделенных из нижних дыхательных путей больных с разным ОФВ₁, как представлено на рисунке 9.

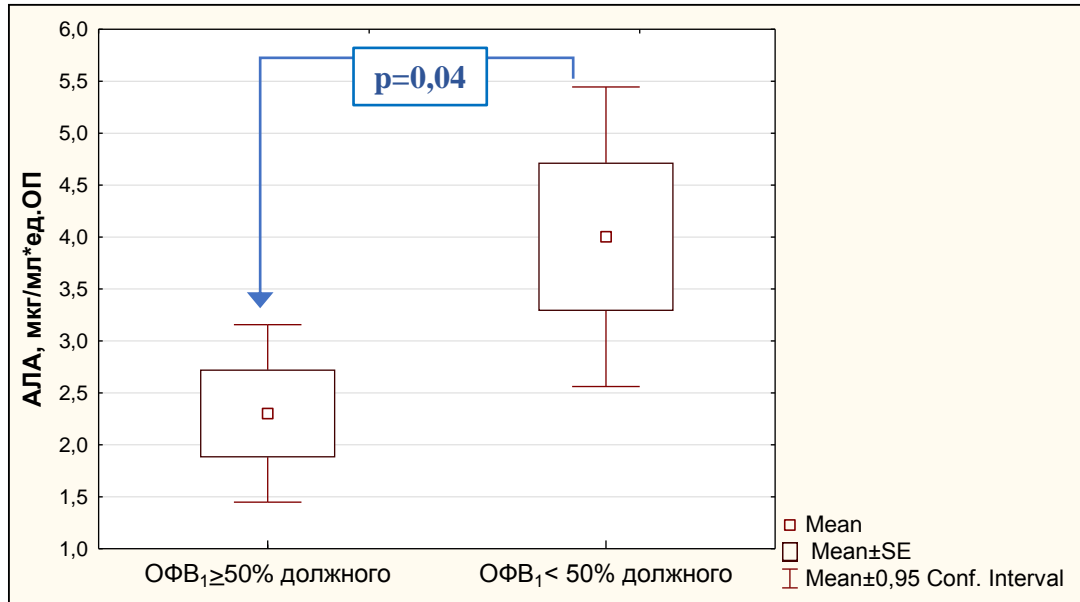


Рисунок 9. Значения АЛА бактерий, выделенных из нижних дыхательных путей больных ХОБЛ с разным ОФВ₁

По данным однофакторного дисперсионного анализа при степенях тяжести GOLD I-IV выявлялись достоверные различия средних значений АЛА как при анализе всех выделенных изолятов ($p_{\text{ОДА}}=0,002$), так и у культур стафилококков ($p_{\text{ОДА}}=0,024$) и энтеробактерий ($p_{\text{ОДА}}=0,008$) по отдельности (рисунок 10).

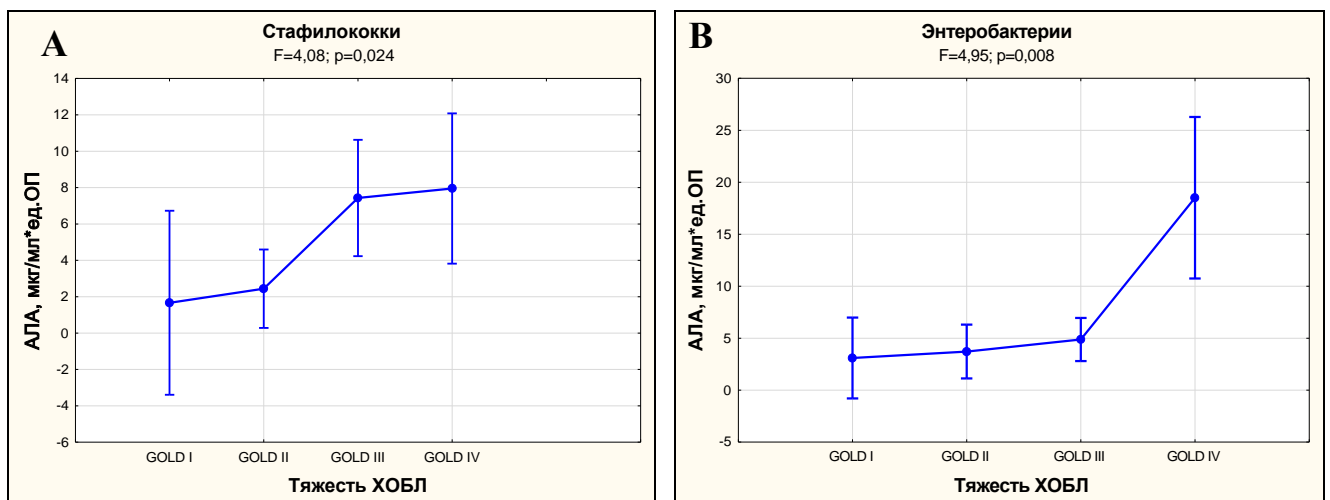


Рисунок 10. Значения АЛА бактерий, выделенных из отделяемого бронхов при разных степенях тяжести ХОБЛ: А. Стафилококки; В. Энтеробактерии (ОДА; $M \pm 0,95$ Conf. Interval)

Активность штаммов стафилококков, полученных от больных с $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного, составляла $2,41 \pm 2,76$ мкг/мл*ед.ОП, что было почти в 3 раза ниже, чем при III–IV степени тяжести ХОБЛ ($6,86 \pm 3,44$ мкг/мл*ед.ОП, $p=0,0009$). Также была выявлена корреляция между уровнем активности стафилококков в отношении лизоцима и степенью тяжести ХОБЛ ($r=0,49$; $p=0,002$). По мере увеличения тяжести бронхообструктивных нарушений нарастала АЛА выделенных штаммов *Staphylococcus spp.*, свидетельствуя об увеличении персистентного потенциала и патогенных свойств этих возбудителей. Для культур энтеробактерий и НГОБ достоверных взаимосвязей АЛА с выраженностью бронхообструктивных нарушений не было выявлено.

Антилактоферриновая активность бактерий направлена против железосвязывающего белка лактоферрина, который входит в состав многих секретов макроорганизма и оказывает бактериостатическое и бактерицидное действие на микроорганизмы [20]. АлфА, представляющая собой один из важных факторов персистенции и патогенности бактерий, была определена у 54 изолятов, полученных из верхних и нижних дыхательных путей больных ХОБЛ (таблица 30).

Таблица 30

Антилактоферриновая активность бактерий, выделенных у больных ХОБЛ

Бактерии	Число штаммов	Значения АЛфА, нг/мл, $M \pm SD$	p
Стафилококки	27	$64,68 \pm 36,00$	$p_{ода} = 0,0001$; $p_{Стафилококки - Энтеробактерии} < 0,0001$; $p_{Стафилококки - НГОБ} = 0,037$; $p_{НГОБ - Энтеробактерии} = 0,14$
Энтеробактерии	22	$10,29 \pm 13,33$	
НГОБ	5	$25,58 \pm 41,59$	

АЛфА проявляли 90,7% всех исследованных культур. Наиболее высокие значения АЛфА отмечались у стафилококков, активность которых была в 2,5 – 6,5 раз выше, чем у НГОБ и энтеробактерий (различия достоверны при $p < 0,05$). При сравнении культур, выделенных из разных отделов респираторного тракта, отмечалась лишь тенденция к более высоким значениям АЛфА у штаммов со слизистых зева и носа по сравнению с НДП ($p=0,09$). Однако, были обнаружены достоверные различия активности у микроорганизмов, полученных от больных с разной степенью бронхообструктивных нарушений. Средние значения АЛфА

бактерий, выделенных от больных с $ОФВ_1 \geq 50\%$ и $ОФВ_1 < 50\%$ должного, составили, соответственно, $48,16 \pm 40,11$ нг/мл и $21,53 \pm 30,71$ нг/мл (различия достоверны при $p=0,01$). Полученные данные свидетельствуют о важности АЛФА для формирования персистентного потенциала на ранних стадиях ХОБЛ. Значения АЛФА коррелировали с уровнем ЛА ($r=0,77$; $p<0,001$), что указывало на существование комплекса взаимосвязанных персистентных и инвазивных характеристик у микроорганизмов, выделенных от больных ХОБЛ.

Антииммуноглобулиновая активность (АИГА) против IgA, IgG и IgM была определена методом радиальной иммунодиффузии в агаре по Манчини у 32 культур бактерий, выделенных из отделяемого бронхов и со слизистой зева и носа больных ХОБЛ, и у 49 культур бактерий – методом ИФА с использованием наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации общих иммуноглобулинов классов А, G, М в сыворотке крови (ЗАО «Вектор-Бест»). При использовании РИД наиболее часто встречалась активность в отношении IgM (у 75% всех изолятов), что было достоверно выше, чем частота АИГА всех изолятов против IgG (46,9%; $p=0,016$) и IgA (25,8%; $p=0,0002$), как показано в таблице 31.

Таблица 31

Частота выявления АИГА в тесте РИД у бактерий, выделенных от больных ХОБЛ

Группы микроорганизмов	АИГА (в тесте РИД)						p
	Анти IgM (1)		Анти IgG (2)		Анти IgA (3)		
	Число штаммов	Число (%) АИГА+ штаммов	Число штаммов	Число (%) АИГА+ штаммов	Число штаммов	Число (%) АИГА+ штаммов	
Стафилококки	16	13 (81,3)	16	9 (56,3)	16	5 (31,3)	$p_{1-2}=0,13$; $p_{1-3}=0,004$; $p_{2-3}=0,15$
Энтеробактерии	12	9 (75)	12	3 (25)	11	1 (9,1)	$p_{1-2}=0,002$; $p_{1-3}=0,004$; $p_{2-3}=0,36$
НГОБ	4	2 (50)	4	3 (75)	4	2 (50)	$p_{1-2}=0,79$; $p_{1-3}=1,0$; $p_{2-3}=0,79$
Все возбудители	32	24 (75)	32	15 (46,9)	31	8 (25,8)	$p_{1-2}=0,02$; $p_{1-3}=0,0001$; $p_{2-3}=0,08$

При сравнении АИГА в отдельных группах микроорганизмов отмечено преобладание частоты анти IgM активности у энтеробактерий в 7,5 раз над АИГА в

отношении IgA и в 3 раза – над АИГА против IgG, а у стафилококков – в 1,5 раза над активностью против IgA. Между разными группами бактерий достоверных различий по наличию АИГА не было, у энтеробактерий отмечалась лишь тенденция к более низкой частоте анти IgG активности по сравнению со стафилококками ($p=0,09$) и НГОБ ($p=0,07$) и анти IgA активности – по сравнению с НГОБ ($p=0,08$). При сравнении культур, выделенных из разных источников, АИГА против IgG у стафилококков из НДП встречалась в 3,6 раз чаще, чем у изолятов со слизистых зева и носа ($p=0,049$). Не было различий по наличию АИГА (РИД) у бактерий, полученных от больных с разной тяжестью ХОБЛ.

Метод ИФА показал более высокую чувствительность при определении АИГА и позволил выявлять этот признак с более высокой частотой, особенно, в отношении анти IgG и анти IgA активностей (таблица 32).

Таблица 32

Частота выявления АИГА в тесте ИФА у бактерий, выделенных от больных ХОБЛ

Микроорганизмы		АИГА (в тесте ИФА)						p
		Анти IgM (1)		Анти IgG (2)		Анти IgA (3)		
Группы	Источник	Число штаммов	Число (%) АИГА+ штаммов	Число штаммов	Число (%) АИГА+ штаммов	Число штаммов	Число (%) АИГА+ штаммов	
Стафилококки	ВДП	7	7 (100)	6	4 (66,7)	6	5 (83,3)	$p_{1-2} = 0,09$
	НДП	21	17 (81)	19	19 (100)*	19	19 (100)	$p_{1-2} = 0,045$; $p_{1-3} = 0,045$
Энтеробактерии	ВДП	0	-	1	1	1	1	n.s.
	НДП	12	10 (83,3)	14	13 (92,9)	13	13 (100)	n.s.
НГОБ	ВДП	2	2	1	1	0	-	n.s.
	НДП	3	2	3	3	1	1	n.s.
Все возбудители	ВДП	9	9 (100)	8	6 (75)	7	6 (85,7)	n.s.
	НДП	36	29 (80)	36	35 (97,2)	33	33 (100)	$p_{1-2} = 0,025$; $p_{1-3} = 0,008$; $p_{2-3} = 0,33$

Примечание: * $p < 0,01$ при сравнении с ВДП; n.s. – не достоверно

Так, исследованные бактерии инактивировали IgM, IgG и IgA в тесте ИФА в 84,4%, 95,7% и 95,9% случаев, а в тесте РИД – в 75%, 46,9% и 25,8%,

соответственно. Достоверных различий по частоте АИГА у штаммов, выделенных из разных отделов респираторного тракта, не было, за исключением стафилококков из НДП, которые проявляли анти IgG активность в 1,5 раза чаще, чем изоляты из ВДП. Возбудители, полученные из отделяемого бронхов, инактивировали IgG и IgA в 97 – 100% случаев, что достоверно превышало анти IgM активность, встречающуюся у 80% изолятов. Достоверные различия частот АИГА против разных классов Ig наблюдались также у стафилококков мокроты.

Также был проведен анализ проявлений АИГА у бактерий, выделенных из НДП больных ХОБЛ разной степени тяжести (рисунок 11). Доля штаммов с широким спектром АИГА, направленной против 3 основных классов Ig, увеличивалась по мере нарастания тяжести ХОБЛ. Бактерии, выделенные из мокроты или БАЛ больных с $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного, инактивировали все 3 класса Ig в 52,9% случаев, а при $ОФВ_1 < 50\%$ должного – в 87% случаев (различия достоверны при $p=0,017$).

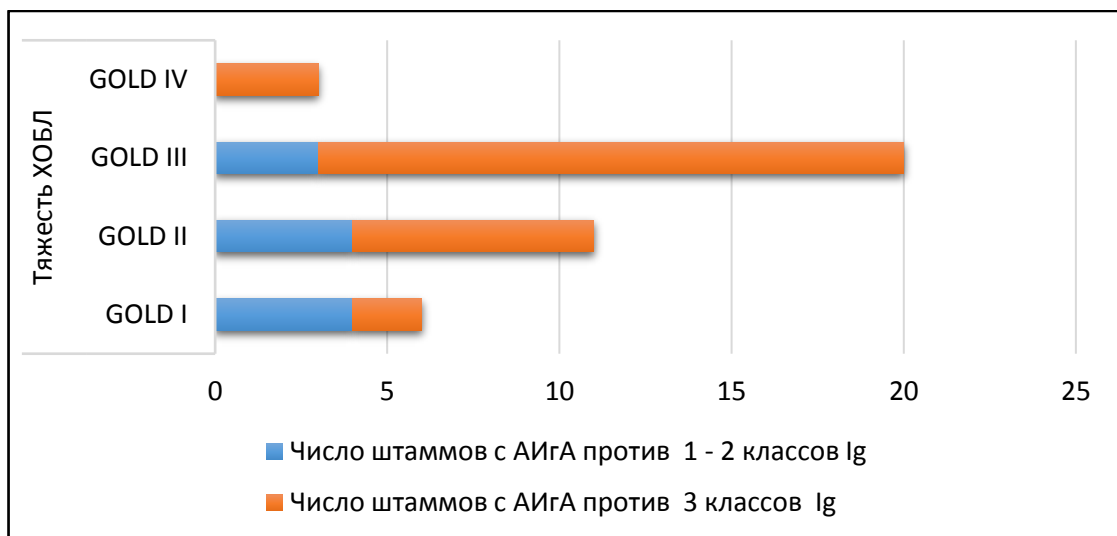


Рисунок 11. Распределение бактерий, выделенных из нижних дыхательных путей больных ХОБЛ, по проявлениям АИГА (в тесте ИФА)

Помимо частоты были изучены уровни АИГА у разных групп бактерий. У стафилококков уровень анти IgM активности ($38,32 \pm 27,35\%$) был повышен по сравнению с энтеробактериями ($20,16 \pm 20,31\%$; $p=0,02$). Сравнительный анализ АИГА микроорганизмов, полученных из разных отделов респираторного тракта, выявил повышение уровня анти IgA активности и тенденцию к повышению анти

IgG активности у стафилококков из НДП по сравнению с культурами со слизистых носа и ротоглотки (анти IgA активность составила $33,50 \pm 13,93\%$ и $16,91 \pm 22,96\%$, соответственно, $p=0,03$; анти IgG активность – $44,19 \pm 32,63\%$ и $14,29 \pm 24,39\%$; $p=0,058$). Полученные данные о частоте и уровне АИГА у *Staphylococcus spp.*, выделенных из разных источников, могут указывать на важность этих свойств для бактериальной колонизации нижних отделов респираторного тракта больных ХОБЛ. Значения АИГА штаммов микроорганизмов, полученных от больных ХОБЛ разной степени тяжести, представлены в таблице 33.

Таблица 33

АИГА микроорганизмов, выделенных у больных ХОБЛ, в тесте ИФА (M±SD)

Тяжесть ХОБЛ Микроорганизмы	GOLD I	GOLD II	GOLD III	GOLD IV	p ода
<i>Анти IgM активность (%)</i>					
Стафилококки	$51,82 \pm 16,61$	$25,96 \pm 16,4$	$33,11 \pm 19,89$	$41,26 \pm 1,21$	0,14
Энтеробактерии	0	$21,59 \pm 17,40$	$13,14 \pm 26,05$	33,1	0,89
НГОБ	н.д.	4,0	$12,95 \pm 1,34$	н.д.	-
Все возбудители	$41,88 \pm 25,75$	$23,77 \pm 16,53$	$18,9 \pm 22,17$	$38,54 \pm 4,79$	0,26
<i>Анти IgG активность (%)</i>					
Стафилококки	$19,90 \pm 22,69$	$27,52 \pm 25,04$	$20,13 \pm 20,89$	$28,6 \pm 10,0$	0,90
Энтеробактерии	$32,30 \pm 5,09$	$20,25 \pm 9,39$	$15,38 \pm 4,80$	25,7	0,97
НГОБ	н.д.	35,7	$4,8 \pm 1,2$	н.д.	-
Все возбудители	$24,03 \pm 18,84$	$25,83 \pm 21,11$	$17,06 \pm 15,78$	$27,63 \pm 1,67$	0,57
<i>Анти IgA активность (%)</i>					
Стафилококки	$7,95 \pm 5,91$	$30,95 \pm 18,99$	$27,9 \pm 15,90$	$47,30 \pm 6,36$	0,049
Энтеробактерии	$12,58 \pm 21,79$	$18,30 \pm 17,97$	$40,31 \pm 16,62$	$42,97 \pm 7,39$	0,035
НГОБ	н.д.	55,3	$36,03 \pm 6,69$	н.д.	-
Все возбудители	$9,93 \pm 13,49$	$27,61 \pm 19,73$	$36,38 \pm 14,94$	$45,14 \pm 6,16$	0,002

Примечание: н.д. – нет данных

При однофакторном дисперсионном анализе были выявлены различия анти IgA активности стафилококков и энтеробактерий, выделенных при разной тяжести ХОБЛ (рисунок 12). Также были обнаружены корреляционные связи между степенью тяжести бронхообструктивных нарушений пациентов и способностью микроорганизмов инактивировать IgA (стафилококки: $r=0,45$, $p=0,025$; энтеробактерии: $r=0,57$, $p=0,0047$). У больных с продвинутыми стадиями ХОБЛ

бронхиальное дерево колонизировали микроорганизмы, обладавшие высоким персистентным потенциалом.

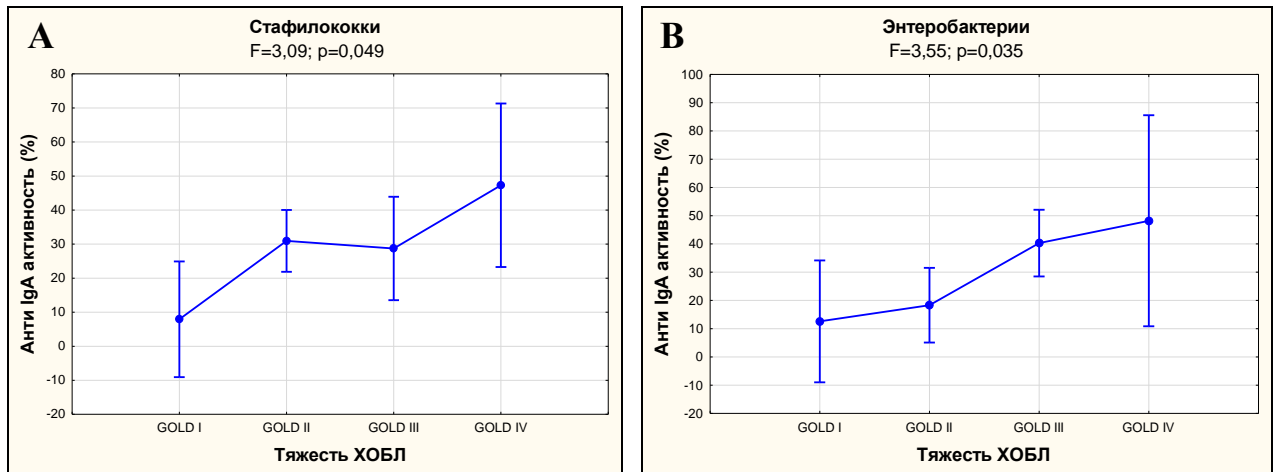


Рисунок 12. Уровни Анти IgA активности бактерий, выделенных от больных с разной степенью тяжести ХОБЛ (в тесте ИФА): А. Стафилококки; В. Энтеробактерии (ОДА; $M \pm 0,95$ Conf. Interval)

У больных ХОБЛ с $ОФВ_1 \geq 50\%$ должно увеличение анти IgA активности бактерий сопровождалось нарастанием микробной нагрузки, о чем свидетельствовали результаты корреляционного анализа. Была выявлена положительная корреляционная связь между этими показателями ($r=0,48$; $p=0,02$), как представлено на рисунке 13.

Отсутствие значимых корреляций между АИГА и обсемененностью дыхательных путей на поздних стадиях ХОБЛ может быть обусловлено более сложным характером взаимодействий и возможным влиянием ряда других факторов (нарушение общего и локального иммунного статуса пациента, наличие сопутствующей патологии, эффекты терапии и т.д.), значимость которых возрастает при увеличении тяжести заболевания и которые могут нивелировать существующие взаимосвязи. Наличие перекрест-синдрома БА-ХОБЛ не оказывало влияния на персистентные свойства выделяемых бактерий. Полученные данные свидетельствуют о роли АИГА против IgA в формировании бактериальной колонизации респираторного тракта при ХОБЛ. Хорошо известно, что именно IgA секретируется на поверхность эпителия слизистых оболочек и участвует в агглютинации и нейтрализации возбудителей, являясь одним из основных факторов местного иммунитета хозяина. Способность микроорганизмов

нейтрализовать этот защитный механизм способствует формированию колонизационной резистентности и длительной персистенции их в дыхательных путях.

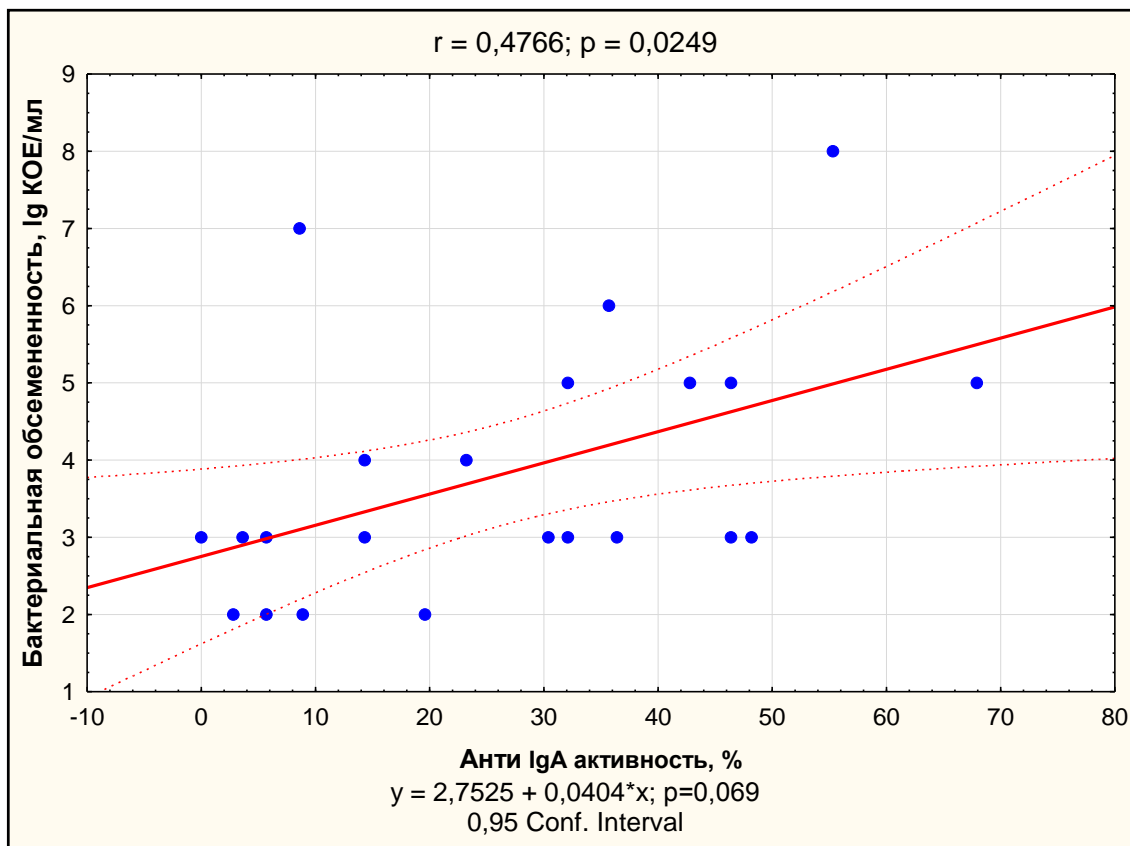


Рисунок 13. Корреляционная связь между бактериальной обсемененностью дыхательных путей и анти IgA активностью микроорганизмов, выделенных у больных ХОБЛ I – II степени тяжести

У возбудителей из НДП были обнаружены множественные взаимосвязи между АИгА и другими персистентными и инвазивными свойствами. Так, была выявлена прямая корреляция между уровнями анти IgG активности и ЛА ($r=0,64$; $p=0,0003$), анти IgA активности и АЛА ($r=0,42$; $p=0,035$), а также отрицательная корреляция между анти IgA АИгА и АЛфА ($r=-0,33$; $p=0,039$). Уровни АИгА против разных классов Ig коррелировали также и между собой. Значения АИгА против IgM были связаны положительной корреляцией с анти IgG активностью ($r=0,38$; $p=0,027$) и отрицательной корреляцией – с анти IgA активностью ($r=-0,42$; $p=0,013$). У микроорганизмов, полученных со слизистых ВДП, была выявлена только корреляция между анти IgM и анти IgA активностями ($r=-0,85$; $p=0,037$).

Выявленные положительные корреляции свидетельствуют о наличии у микроорганизмов, высеянных из отделяемого бронхов при ХОБЛ, целого комплекса взаимосвязанных персистентных характеристик, что отличает их от бактерий, населяющих ВДП. Обнаруженные отрицательные корреляции, видимо, носят косвенный характер. Отрицательные корреляции, связывающие анти IgA АИГА с АЛФА и анти IgM активностью, могут быть обусловлены тем фактом, что бактерии, выделяемые у больных ХОБЛ разной тяжести, отличаются набором персистентных характеристик. При ХОБЛ I – II степени в микробиоценозе респираторного тракта преобладала грамположительная флора, включая стафилококки, а у них активность в отношении лактоферрина и IgM была достоверно выше, чем у энтеробактерий, доля которых возрастала при поздних стадиях заболевания. При этом анти IgA активность у всех бактерий увеличивалась при прогрессировании брохообструктивных нарушений.

4.4. Обсуждение результатов

При микробиологическом исследовании нами были выявлены признаки микробной колонизации НДП: у 84,7% пациентов стабильной ХОБЛ в образцах мокроты и БАЛ выделялись бактериальные и/или грибковые возбудители. Согласно результатам других исследователей, бактериальная обсемененность слизистых ДП при стабильной ХОБЛ определяется у 40,9 – 83% больных [183, 311]. По данным R. Zalacain et al. (1999) факторами, влияющими на бактериальную колонизацию, являются степень бронхиальной обструкции, статус курения, источник получения биоматериала [311]. При этом частота выявления и видовой состав возбудителей при стабильной фазе ХОБЛ мало отличается от обострения. Обследованные в настоящей работе пациенты были курильщиками (более 2/3 продолжали курить) и более чем у 1/2 пациентов определялась III-IV степень обструктивных нарушений, что объясняет высокий процент положительных результатов микробиологического обследования. Бактериальная колонизация дыхательных путей может рассматриваться как начальный этап инфекционного процесса, поддерживающий хроническое воспаление [62].

Исследование микробного пейзажа отделяемого бронхов, зева и носа больных ХОБЛ позволило установить, что в составе микрофлоры НДП доминировали стафилококки, энтеробактерии, НГОб и грибы рода *Candida* в ассоциациях с представителями нормальной микрофлоры ротоглотки – стрептококками, нейссериями, стоматококками. Выявлено значительное сходство в составе микробиоценоза зева и отделяемого бронхов у всех обследованных больных, однако в составе микрофлоры отделяемого НДП чаще, чем на слизистой зева, присутствовали энтеробактерии и НГОб, особенно при III – IV степени тяжести ХОБЛ. Обнаружено высокое содержание коагулазоотрицательных стафилококков на слизистой носа у всех обследованных больных. Таким образом, удалось установить, что наиболее характерными для отделяемого бронхов больных хроническими заболеваниями НДП, кроме представителей нормальной микрофлоры ротоглотки, были стафилококки, энтеробактерии и НГОб. Совпадение видового состава мокроты/БАЛ с микробным пейзажем слизистой зева, но не носовой полости, видимо, объясняется аспирационным механизмом заселения бронхов бактериями при воспалительных заболеваниях респираторного тракта. На это указывает и выявленная ранее другими авторами корреляция между орофарингеальными микробиотическими сообществами и сообществами, полученными из браш-биоптатов бронхов и лаважной жидкости [123]. Выявленное сходство поддерживает тезис «единства верхних и нижних дыхательных путей», разрабатываемый и другими авторами [73].

У больных с низкими значениями $ОФВ_1$ в мокроте и БАЛ чаще выявлялись представители семейства энтеробактерий и НГОб, что соответствует современным представлениям об этиологической роли грамотрицательной микрофлоры при ХОБЛ [323, 381]. Также у них чаще встречались микробные ассоциации, нередко включающие кандиды, по сравнению с ранними стадиями ХОБЛ. Выявление кандид в отделяемом НДП было ассоциировано с клиническими признаками иммунодефицитных состояний.

Вместе с тем, невелико было значение гемофильной палочки и моракселл, которые занимают существенное место в этиологическом «портрете» ХОБЛ у

пациентов европейского континента [323, 344, 381]. Однако для реальной клинической практики наиболее важным является изучение спектра потенциальных респираторных патогенов с учетом региональных особенностей их распространения, включая оценку антибиотико-устойчивости и других биологических свойств. В этой связи представляют интерес результаты исследования микробиоценоза дыхательных путей у больных бронхообструктивными заболеваниями в регионах Российской Федерации, проведенные в 2000-х годах, которые выявили спектр возбудителей, сходный с полученным нами. По данным А.Ю. Миронова (2002) в Московской области основными возбудителями инфекций нижних дыхательных путей являлись условно-патогенные микроорганизмы, обуславливающие дисбиоз верхних отделов респираторного тракта, и госпитальный штамм синегнойной палочки [75]. По мнению автора, вследствие нерациональной антибактериальной терапии происходит изменение этиологической структуры гнойно-воспалительных заболеваний органов дыхания: на место общепризнанных патогенов, таких как пневмококки, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, выходят микробы, которым ранее не уделялось должного внимания: коагулазоотрицательные стафилококки (преимущественно эпидермальный стафилококк), энтерококки и зеленящие стрептококки. Исследования А.Е. Билева (2003) также выявили нарушения микробной экологии бронхолегочного аппарата при ХОБЛ и БА, которые заключались в колонизации условно-патогенными микроорганизмами [14]. В микробном пейзаже мокроты отмечена высокая встречаемость стрептококков, стафилококков, энтерококков, нейссерий и коринебактерий при ведущей роли пневмококков и *Haemophilus influenzae*, часто выявлялись микробные ассоциации, состоявшие из 2-7 видов УПБ. Суммарная обсемененность мокроты достигала от $6,5 \pm 0,3$ до $7,4 \pm 0,4$ lg КОЕ/мл. Факторами риска, определяющими характер дисбиотических изменений и их выраженность, являлись тяжесть и фаза течения ХОБЛ. В работе В.И. Никуличевой и соавторов (2007) при исследовании бактериального и микотического пейзажа мокроты у пациентов с ХОБЛ в большинстве случаев выделялись микроорганизмы,

относящихся к индигенной или факультативной микрофлоре других биотопов организма хозяина [138]. Представители микробиоценоза ВДП (стрептококки, нейссерии) встречались более чем у 50% больных, КОС – у 8,16% больных, представители кишечной микрофлоры (*E. coli*, энтерококки) – у 18,37%, кандиды – у 14,28% пациентов. Только в 6,12% случаев из мокроты высевались пневмотропные патогены *H. influenza* и *S. aureus*. Аналогичные результаты были получены ранее и в Нижегородской области при исследовании больных с хроническими бронхитами и бронхиальной астмой [43, 95]. При изучении особенностей ХОБЛ у больных Ставропольского края отмечалась высокая частота обнаружения дифтероидов и нейссерий в мокроте, коррелировавшая с признаками сенсibilизации и угнетением иммунного ответа [9]. При ХОБЛ, ассоциированной с раком легких, основными возбудителями были условно-патогенные микроорганизмы, не являющиеся пневмотропными – энтеробактерии, псевдомонады и грибы [143].

Исследование антибиотикорезистентности культур бактерий, выделенных из НДП, выявило большой процент полирезистентных штаммов, которые при тяжелой и очень тяжелой ХОБЛ встречались в 2 раза чаще, чем при I – II степени тяжести, однако все исследованные культуры бактерий сохранили высокую чувствительность к респираторному фторхинолону. Также показана высокая чувствительность культур грибов рода *Candida* к нистатину.

Впервые была проведена комплексная оценка свойств персистенции условно-патогенных бактерий, населяющих верхние и нижние дыхательные пути, у больных ХОБЛ разной степени тяжести. Установлено, что выделенные культуры бактерий в различной степени обладали адгезивными свойствами, антилизосимной, антилактоферриновой, антииммуноглобулиновой активностями, секретировали протеазы разной природы. Способность к образованию биопленок была наиболее характерна для НГОБ и КОС. Синегнойная палочка и стафилококки, населяющие НДП, обладали высокой протеолитической и лизоцимной активностью. Более 60% стафилококков и энтеробактерий проявляли высокие уровни активности в отношении лизоцима, которые были ассоциированы с

тяжелой и очень тяжелой ХОБЛ. АЛФА, напротив, была более выражена при ранних стадиях ХОБЛ. АИГА (в тесте ИФА) проявляли 84 – 96% всех исследованных культур. У энтеробактерий и стафилококков активность против IgA повышалась при увеличении тяжести ХОБЛ. Также широкий спектр АИГА против 3-х классов Ig чаще обнаруживался у изолятов, полученных при III – IV степени тяжести ХОБЛ. У микроорганизмов, выделенных из очага воспалительного процесса, были обнаружены положительные корреляции между различными видами активностей (между ЛА и АЛА, анти IgM и анти IgG АИГА, ЛА и анти IgG АИГА, АЛА и анти IgA АИГА), что указывает на наличие у этих бактерий целого комплекса взаимосвязанных персистентных и инвазивных свойств, которые вооружают их носителей дополнительными механизмами для колонизации НДП [50, 95, 137].

Большой интерес представляют потенциальные механизмы влияния бактериальной инфекции на патогенез и течение ХОБЛ, которые активно обсуждаются в литературе [164, 289, 317, 344, 346]. С учетом собственных и литературных данных можно выделить следующие факторы: 1) персистирующие в респираторных тканях бактериальные патогены нарушают ответ организма хозяина на табакокурение и индуцируют хроническое воспаление при ХОБЛ; 2). бактериальные патогены респираторного тракта формируют механизмы ускользания от защитных систем хозяина, угнетают иммунный ответ макроорганизма, поддерживая колонизационную резистентность и микробную колонизацию; 3) бактериальная колонизация НДП усиливает хронический воспалительный ответ и ведет к прогрессированию бронхиальной обструкции, замыкая порочный круг; 4) бактериальные антигены в НДП индуцируют реакции гиперчувствительности, вызывающие гиперреактивность бронхов и эозинофильное воспаление, что вносит вклад в формирование фенотипа ХОБЛ – БА.

Таким образом, у большинства больных стабильной ХОБЛ обнаружена колонизация НДП грибковыми и бактериальными возбудителями, среди которых доминируют представители нормофлоры ВДП и условно-патогенные

микроорганизмы. Изучение биологических характеристик условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из дыхательных путей больных ХОБЛ, позволяет констатировать их высокую агрессивность в местах локализации воспалительного процесса вследствие наличия комплекса взаимосвязанных персистентных и патогенных свойств. Прогрессирование ХОБЛ сопровождается возрастанием этиологической роли грамотрицательных бактерий (энтеробактерий и неферментирующих бактерий), увеличением числа микробных ассоциаций и полирезистентных штаммов, усилением антилизосимной и антиглобулиновой активности бактерий. Важным аспектом является исследование особенностей микробиоценоза разных отделов респираторного тракта и оценка взаимоотношений условно-патогенных бактерий с представителями нормальной микрофлоры, которые при определенных условиях (например, при ослаблении защитных систем макроорганизма) способны инициировать воспаление и стать причиной колонизации бронхиального дерева.

ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ, МАРКЕРАМИ ИММУННОГО ОТВЕТА БОЛЬНЫХ И ОСОБЕННОСТЯМИ РЕСПИРАТОРНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

5.1. Корреляционные связи между клинико-анамнестическими, функциональными характеристиками больных и микробной нагрузкой

У больных стабильной ХОБЛ (без признаков активации воспаления) были изучены корреляционные связи между клинико-анамнестическими показателями и параметрами ФВД. Были обнаружены множественные позитивные корреляции между индексом курения, числом обострений, выраженностью одышки и баллом оценочного теста ХОБЛ (рисунок 14).

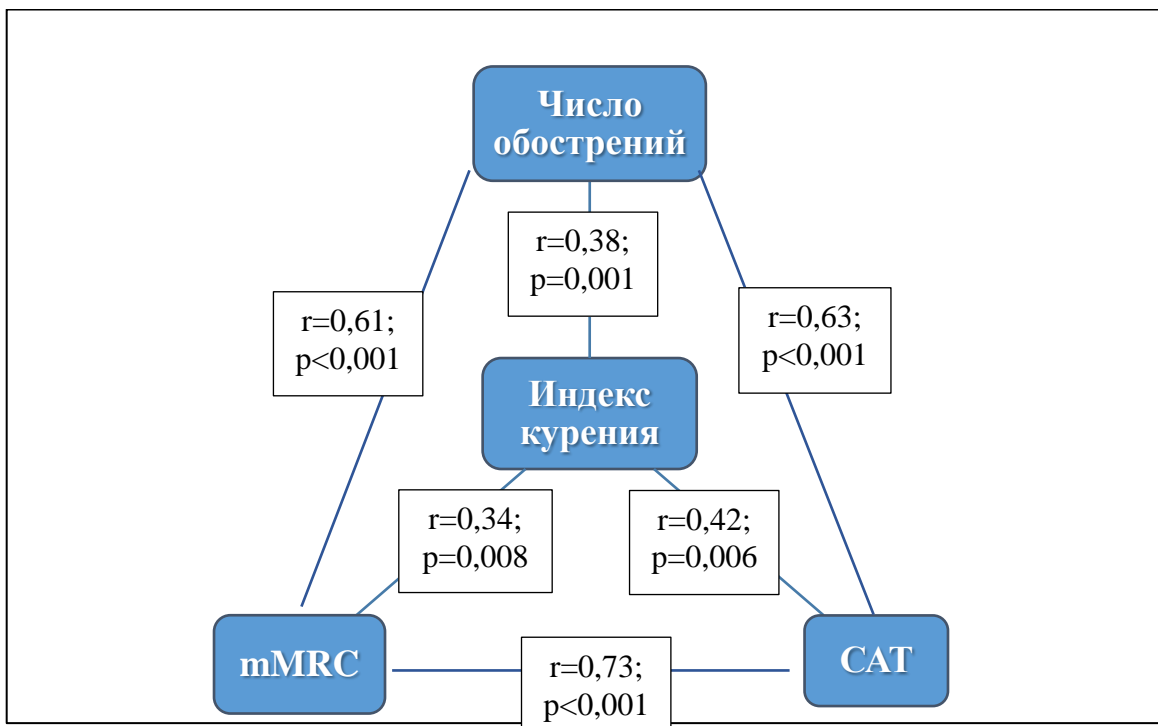


Рисунок 14. Корреляционные связи между индексом курения и клиническими показателями

Отрицательные корреляции связывали индекс курения и другие клинико-анамнестические показатели (индекс одышки по mMRC, балл CAT-теста, частоту обострений за предыдущий год) с функциональными легочными параметрами

(таблица 34). Выявленные корреляционные связи подтверждают значимость кумулятивного действия курения в прогрессировании заболевания, что соответствует современным представлениям об основных факторах риска и патогенезе ХОБЛ [214].

Таблица 34

Корреляционные связи клинических характеристик с функциональными параметрами и показателями бактериального воспаления дыхательных путей у больных ХОБЛ; коэффициенты корреляции Спирмена r , (p)

Показатели	Индекс курения	Число обострений	САТ-тест	mMRC
ОФВ ₁	-0,47 (0,001)	-0,59 (0,001)	-0,39 (0,001)	-0,67 (0,001)
ЖЕЛ	-0,29 (0,02)	-0,41 (0,001)	-0,49 (0,007)	-0,45 (0,001)
МОС50	-0,41 (0,004)	-0,53 (0,001)	n.s.	-0,46 (0,001)
МОС75	-0,42 (0,004)	-0,53 (0,001)	n.s.	-0,55 (0,001)
Лейкоциты мокроты	n.s.	n.s.	n.s.	0,38 (0,02)
Количество видов бактерий в мокроте	n.s.	n.s.	n.s.	0,7 (0,01)
Бактериальная обсемененность	n.s.	n.s.	n.s.	0,68 (0,01)

Примечание: n.s. – не достоверно

Кроме того, были установлены связи между выраженностью одышки и бактериального воспаления НДП: индекс одышки был связан положительными корреляциями с показателями микроскопического и микробиологического исследования мокроты (количеством лейкоцитов, общей микробной нагрузкой и количеством видов выделенных микроорганизмов), как представлено в таблице 34. Зависимость клинических проявлений от наличия микробной колонизации и интенсивности воспаления дыхательных путей при бронхообструктивных заболеваниях была продемонстрирована и другими авторами [162, 177, 323, 334].

5.2. Корреляционные связи между клинико-функциональными характеристиками и маркерами иммунного ответа пациентов

Были исследованы взаимосвязи между клиническими и иммунологическими маркерами у больных ХОБЛ. Уровень ингибитора апоптоза – димера sCD95 – был связан положительной корреляционной связью с длительностью заболевания ($r=0,42$; $p=0,002$) и возрастом больных ($r=0,26$; $p=0,015$), что, видимо, отражает ослабление механизмов Fas-зависимого апоптоза в более старшей возрастной группе. Выраженность одышки (по mMRC) коррелировала с концентрацией острофазовых маркеров – олигомерных фракций молекул адгезии sCD54 ($r=0,21$; $p=0,047$) и антигена sCD14 ($r=0,37$; $p=0,03$), маркера зрелых моноцитов/макрофагов, избыточный уровень которого характерен для инфекционного воспаления.

Отрицательные корреляционные связи были выявлены между индексом курения и уровнями антигенов sCD8 ($r=-0,29$; $p=0,01$), sCD25 ($r=-0,28$; $p=0,01$), суммарного антигена sCD38 ($r=-0,32$; $p=0,01$). Такие важные клинические показатели, как степень тяжести ХОБЛ и годовая частота обострений, были связаны негативными корреляциями с содержанием антигенов sCD8 ($r=-0,26$; $p=0,01$ и $r=-0,21$; $p=0,04$), sCD25 ($r=-0,30$; $p=0,004$ и $r=-0,26$; $p=0,015$), а также суммарных фракций антигенов sCD38 ($r=-0,31$; $p=0,003$ и $r=-0,3$; $p=0,004$) и sCD95 ($r=-0,22$; $p=0,04$ и $r=-0,24$; $p=0,02$). Снижение содержания модулятора апоптоза sCD95 при нарастании спирометрической тяжести и частоты обострений ХОБЛ ведет к усилению запрограммированной гибели Т-лимфоцитов, что сопровождается уменьшением сывороточных концентраций как молекул sCD25 и sCD38, маркеров активированных лимфоцитов, так и антигена sCD8, маркера цитотоксических/супрессорных Т-лимфоцитов, играющих ключевую роль в воспалении при ХОБЛ.

Корреляции разнонаправленного характера связывали содержание растворимых адгезивных молекул sCD50 с клинико-функциональными показателями: отрицательные – с индексом курения и тяжестью бронхиальной обструкции ($r=-0,25$; $p=0,02$ и $r=-0,21$; $p=0,04$, соответственно), положительная – с

продолжительностью заболевания ($r=0,23$; $p=0,03$). Противоречивость этих результатов можно объяснить тем, что длительность анамнеза ХОБЛ по данным первичной медицинской документации не всегда можно считать достоверной из-за гиподиагностики и поздней диагностики заболевания [148, 282]. В связи с этим более информативным показателем оказался индекс курения, отражающий кумулятивное действие повреждающих агентов табачного дыма. Значимость этого показателя демонстрируют множественные корреляции между индексом курения и клиническими, функциональными, иммунологическими показателями. Как и следовало ожидать, увеличение интенсивности курения ассоциировалось с прогрессированием бронхиальной обструкции, нарастанием индекса одышки, балла САТ-теста и более частыми обострениями (рисунок 14 и таблица 34). Кроме того, повышение индекса курения сопровождалось уменьшением содержания молекул адгезии sICAM-3, маркеров цитотоксических Т-лимфоцитов и активации клеток (молекул sCD8, sCD25, суммарных фракций sCD38), что свидетельствовало об угнетении клеточного звена иммунного ответа у «злостных» курильщиков.

Снижение уровней антигенов sCD95, sCD8, sCD25, sCD38 и sCD50 при прогрессировании заболевания, коррелировавшее с нарастанием степени функциональных нарушений и частоты обострений, можно рассматривать как проявление депрессии клеточного иммунитета вследствие дисрегуляции апоптоза, ослабления процессов активации Т-лимфоцитов, угнетения межклеточных взаимодействий и миграционных способностей клеток. В свою очередь, уменьшение защитного потенциала ведет к активации бактериальной флоры, что подтверждает наличие отрицательной связи между содержанием sCD8 в сыворотке больных и количеством видов микроорганизмов, выделяемых из мокроты ($r=-0,57$; $p=0,04$).

Корреляций между сывороточным содержанием растворимых дифференцировочных антигенов и показателями общего анализа крови, а также сатурацией O_2 при стабильной ХОБЛ не было.

У больных стабильной ХОБЛ также были изучены взаимосвязи между содержанием растворимых дифференцировочных молекул иммунных клеток и

функциональными легочными параметрами (таблица 35). Не было установлено связей между жизненной ёмкостью легких при спокойном или форсированном дыхании (ЖЕЛ, ФЖЕЛ) и концентрацией растворимых дифференцировочных антигенов, однако объёмные скоростные показатели ФВД коррелировали с содержанием маркеров активации лимфоцитов, молекул главного комплекса гистосовместимости, модулятора апоптоза и молекул адгезии. Так, значения $ОФВ_1$ были связаны положительной корреляцией с концентрациями молекул sCD8, sCD25 и суммарного антигена sCD38, а показатели МОС25 и МОС50, характеризующие бронхиальную проходимость на уровне крупных и средних бронхов – ещё и с содержанием суммарных антигенов sCD95 и sCD54.

Таблица 35

Корреляционные связи между содержанием растворимых дифференцировочных молекул лейкоцитов и показателями ФВД у больных стабильной ХОБЛ; коэффициенты корреляции Спирмена r , (p)

Показатель	Индекс Тиффно	$ОФВ_1$	ПОС	МОС25	МОС50	МОС75
sCD95 суммарный	0,3 (0,03)	n.s.	n.s.	0,29 (0,015)	0,26 (0,03)	n.s.
sCD95 димер	-0,28 (0,04)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
sCD54 суммарный	n.s.	n.s.	n.s.	0,27 (0,025)	0,24 (0,043)	0,61 (0,017)
sCD8	n.s.	0,57 (0,03)	n.s.	0,24 (0,047)	0,24 (0,04)	0,59 (0,02)
sCD38 суммарный	n.s.	0,28 (0,01)	n.s.	0,36 (0,002)	0,32 (0,006)	n.s.
sCD25	n.s.	0,25 (0,02)	0,45 (0,02)	0,31 (0,009)	0,25 (0,03)	0,67 (0,006)
sHLA-I	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,64 (0,009)
sHLA-DR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,56 (0,031)

Примечание: n.s. – не достоверно

Кроме того, были зарегистрированы умеренные корреляционные связи между МОС75, отражающим скорость воздушного потока на уровне мелких

бронхов, и сывороточным содержанием антигенов sCD8, sCD25, суммарного антигена sCD54, а также молекул гистосовместимости I и II класса. ПОС коррелировала только с уровнем антигена sCD25. Были обнаружены разнонаправленные связи между индексом Тиффно и регуляторами апоптоза: положительная корреляция с суммарным антигеном sCD95 и отрицательная корреляция с димером sCD95, что может быть связано с различной функциональной активностью разных молекулярных фракций растворимого Fas антигена.

Учитывая важное значение цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов в патогенезе ХОБЛ и наличие тесной корреляции между бронхиальной обструкцией и сывороточным содержанием sCD8, можно было предположить также наличие аналитической связи между данными показателями. На основании простого линейного регрессионного анализа была выявлена аналитическая зависимость между ОФВ₁ и уровнем sCD8, что представлено на рисунке 15. Стандартная ошибка оценки модели составила 64,49 при $p=0,0002$.

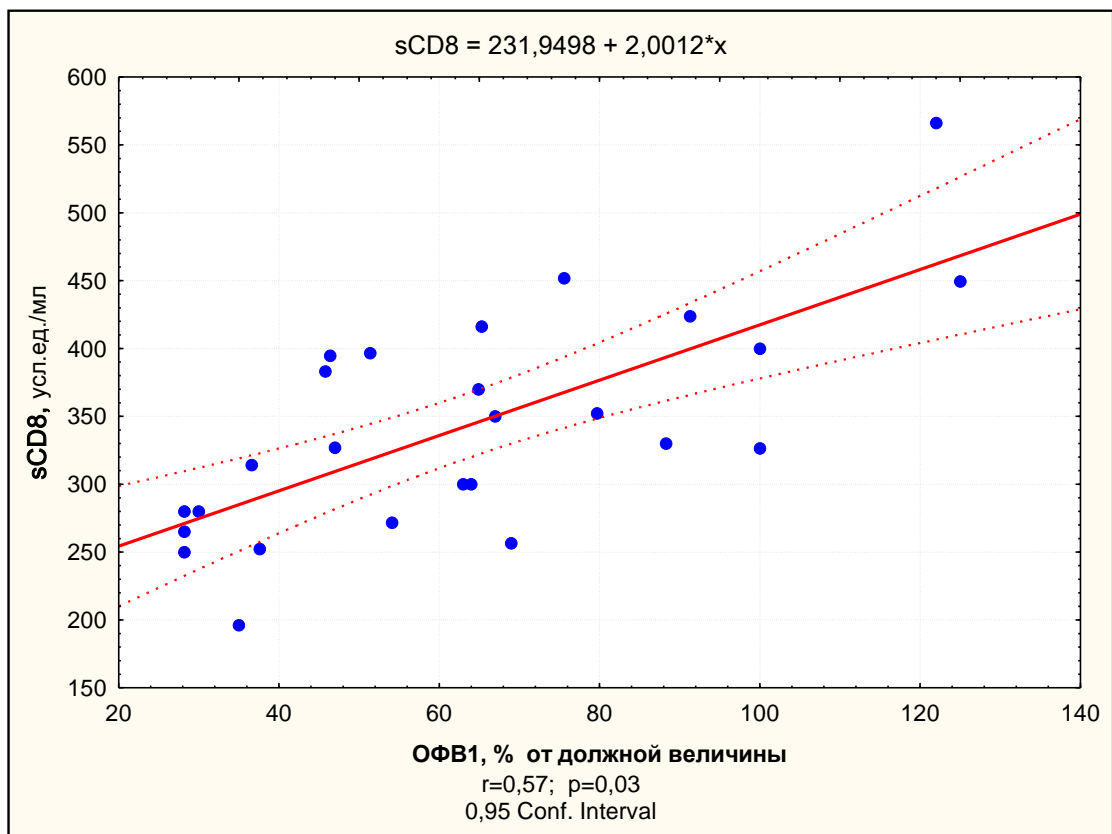


Рисунок 15. Регрессионная зависимость между ОФВ₁ и сывороточным уровнем молекул sCD8 у больных ХОБЛ

Обнаруженные в результате корреляционного и регрессионного анализа связи между содержанием растворимых дифференцировочных молекул и параметрами ФВД свидетельствуют об участии иммунных механизмов в развитии и прогрессировании бронхообструктивных нарушений при ХОБЛ. Следует отметить, что литературные данные о характере взаимоотношений между легочной функцией и содержанием исследованных биомаркеров у больных бронхообструктивными заболеваниями противоречивы и малочисленны; наиболее изученными являются растворимые молекулы ICAM-1. Мета-анализ 7 популяционных исследований кардиоваскулярных факторов риска, дизайн которых включал исследование ФВД и биомаркеров, выявил отрицательную корреляцию между sICAM-1 и $ОФВ_1$ в генеральной популяции, хотя результаты генотипирования не подтвердили причинно-следственного характера этих взаимоотношений [161]. Однако следует отметить, что в цитируемой работе контингент обследованных преимущественно составляли лица без нарушений бронхиальной проходимости со средним $ОФВ_1$ $94,8 \pm 16,9\%$ должного. Между тем характер взаимоотношений между показателями ФВД и биомаркерами у больных обструктивными заболеваниями требует отдельного изучения, так как наличие оксидативного стресса, хронического воспаления и гипоксии может модифицировать иммунный ответ и существующие связи с функциональными характеристиками. Так, при бронхиальной астме С. Hollander et al. (2007) обнаружили положительную связь индекса Тиффно с содержанием молекул sICAM-1 в лаважной жидкости и отрицательную – с их концентрацией в сыворотке крови [342], в то время как по данным Н.А. Геппе с соавторами (2009) корреляция между сывороточным sICAM-1 и $ОФВ_1$ носила положительный характер [29]. Н.А. Любавина и соавторы (2012) обнаружили отрицательную корреляцию между уровнем молекул адгезии sICAM-1, антигенов sCD8, sCD95, sHLA-I и $ОФВ_1$ у больных бронхиальной астмой и прямую связь – при ХОБЛ [66]. Эти различия могут быть объяснены сложным нелинейным характером взаимодействий между исследуемыми параметрами в условиях патологии.

5.3. Корреляционные связи клинико-функциональных и иммунологических характеристик больных с персистентными свойствами выделенных у них бактерий

Корреляционный анализ позволил установить связи между клинико-функциональными показателями больных ХОБЛ и выраженностью факторов персистенции УПБ, выделенных со слизистых респираторного тракта. Нарастание интенсивности курения было ассоциировано с увеличением АИГА микроорганизмов, о чем свидетельствовала положительная корреляция между индексом курения и способностью бактерий инактивировать IgM ($r=0,42$; $p=0,02$).

Была выявлена отрицательная корреляция между ЖЕЛ больных и анти-IgM активностью микробной флоры ($r=-0,59$; $p=0,019$). МОС75 была связана отрицательной корреляцией с анти-IgG АИГА ($r=-0,51$; $p=0,04$) и положительной – с АЛФА ($r=0,5$; $p=0,02$). Более высокие значения бактериальной АЛФА, наблюдаемые при начальных нарушениях бронхиальной проходимости, видимо, обусловлены биологическими свойствами стафилококков (обладающих самой высокой АЛФА), выявляемость которых на ранних стадиях ХОБЛ была выше, что позволяет объяснить обнаруженную положительную корреляцию. Установленные отрицательные связи между бактериальными факторами персистенции и параметрами ФВД показали, что при нарастании рестриктивных и обструктивных нарушений у больных выделялась микрофлора с более высокой ингибирующей активностью в отношении двух основных классов иммуноглобулинов – IgM и IgG.

Также были проанализированы взаимосвязи между уровнем растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов в сыворотке больных ХОБЛ и персистентными характеристиками бактериальной микрофлоры, выделенной со слизистых дыхательных путей этих больных. Умеренные отрицательные корреляции были обнаружены между сывороточным содержанием димера sCD38 у пациентов и антилизоцимной ($r=-0,31$; $p=0,047$), антилактоферриновой ($r=-0,38$; $p=0,03$) и анти-IgM ($r=-0,44$; $p=0,045$) активностью микроорганизмов. Микробная антилактоферриновая активность коррелировала также с концентрацией молекул

гистосовместимости I класса ($r=-0,34$; $p=0,04$), а содержание антигенов sCD8 в крови больных – с лизоцимной ($r=-0,49$; $p=0,01$) и анти-IgM активностью ($r=-0,46$; $p=0,03$) микрофлоры; причем последняя корреляционная связь была более выражена у Грам-негативных бактерий ($r=-0,62$; $p=0,04$). У грамположительных бактерий содержание суммарного sCD38 антигена было связано отрицательной корреляцией с АЛА ($r=-0,48$; $p=0,017$), а его олигомерных фракций – с анти-IgA АИГА ($r=-0,63$; $p=0,01$), что указывало на усиление механизмов, нацеленных против факторов локального иммунитета, у микроорганизмов, выделенных от больных с более низким уровнем растворимых молекул sCD38, участвующих в регуляции пролиферации и дифференцировки Т и В лимфоцитов, а также в мобилизации Ca^{++} и развитии бронхоспазма [114]. Таким образом, у больных ХОБЛ с низким уровнем растворимых молекул – маркеров активации Т-клеточного звена (sCD38, sCD8 и sHLA-I), который был характерен для пациентов 1-го кластера, из дыхательных путей высевалась микрофлора с более высокими инвазивными и персистентными характеристиками, что сопровождалось менее благоприятным течением заболевания с склонностью к частым обострениям, более высоким индексом одышки и САТ-теста, выраженными обструктивными нарушениями.

Положительные корреляции умеренной силы были выявлены между уровнем растворимых молекул межклеточной адгезии – димеров sCD54 в крови больных и способностями бактерий инактивировать лизоцим ($r=0,39$; $p=0,02$) и IgA ($r=0,53$; $p=0,003$). У грамположительных микроорганизмов не только способность инактивировать лизоцим хозяина, но и способность продуцировать собственный лизоцим коррелировала с уровнем адгезивных молекул, а именно, димера sCD54 в крови пациента ($r=0,51$; $p=0,025$ для АЛА и $r=0,76$; $p=0,001$ для ЛА), косвенно указывая на то, что формирование у бактерий лизоцимной и антилизоцимной активности происходит при взаимодействии их с активированными факторами иммунитета, например, привлеченными в очаг воспаления фагоцитирующими клетками – продуцентами лизоцима.

Положительные корреляционные связи умеренной силы были также обнаружены между содержанием антигена sCD25 в сыворотке больных и анти-IgG

активностью микроорганизмов ($r=0,64$; $p=0,02$), причем у грамотрицательных бактерий эта корреляция носила характер сильной связи ($r=0,74$; $p=0,035$). Действуя через свой рецептор CD25, интерлейкин-2 выполняет функции центрального регулятора специфического иммунного ответа, не только вызывая пролиферацию эффекторных Т-лимфоцитов, но и усиливая В-клеточный рост и антителообразование [76]. Для микроорганизмов способность инактивировать основной фактор гуморального противоинфекционного иммунитета – иммуноглобулин класса G – является важным механизмом выживания и персистенции. Формирование АИГА, видимо, осуществляется под влиянием факторов иммунной защиты организма хозяина, на что указывают выявленные положительные корреляционные связи. Можно предполагать, что активация системы интерлейкин-2/рецептор к интерлейкину-2, усиливающая адаптивный иммунный ответ, способствует селекции бактерий, обладающих выраженными персистентными свойствами, такими как АИГА. С другой стороны, возможно, что внедрение микроорганизмов с высокими защитными характеристиками сопровождается усилением системы специфического иммунитета у пациентов ХОБЛ.

Исследование характера взаимоотношений между характеристиками микрофлоры и особенностями иммунного ответа пациентов с разной степенью тяжести ХОБЛ показало, что соответствующие отрицательные и положительные корреляции выявлялись, в основном, при $ОФВ_1 \geq 50\%$ от должной величины (таблица 36). При III-IV степени тяжести ХОБЛ была обнаружена только отрицательная корреляционная связь между димером sCD38 и анти-IgG активностью микроорганизмов ($r=-0,66$; $p=0,037$). Вместе с тем, как было показано ранее, инвазивная и персистентная активность бактерий, выделенных от больных с III-IV степенью тяжести ХОБЛ, как правило, была выше, чем при I-II степени. Можно предполагать, что у УПБ, выделенных от больных с ранними стадиями ХОБЛ, формирование персистентных свойств происходит в процессе взаимодействия с активированными факторами иммунитета организма хозяина и в определенной степени зависит от них.

Таблица 36

Корреляционные связи между персистентными характеристиками микрофлоры и содержанием растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов у больных с ОФВ₁≥50% должного, коэффициенты корреляции Спирмена r, (p)

Показатель	ЛА	АЛФА	Анти-IgM	Анти-IgG	Анти-IgA
sCD95 димер	ns	-0,72 (0,0003)	ns	ns	ns
sCD54 димер	0,47 (0,043)	ns	ns	ns	0,56 (0,017)
sCD8	-0,63 (0,004)	-0,57 (0,009)	-0,60 (0,018)	ns	ns
sCD38 суммарный	-0,50 (0,021)	-0,45 (0,037)	ns	ns	ns
sCD38 димер	ns	-0,47 (0,036)	-0,52 (0,048)	ns	ns
sCD25	ns	ns	ns	0,74 (0,015)	ns
sCD50	-0,45 (0,041)	-0,49 (0,022)	ns	ns	ns
sHLA I	-0,46 (0,035)	-0,65 (0,001)	ns	ns	ns
sHLA DR	ns	-0,51 (0,015)	ns	ns	ns

В отличие от этого при тяжелой и крайне тяжелой ХОБЛ, с одной стороны, наблюдается угнетение многих факторов иммунной защиты пациентов, а с другой стороны, возбудителями являются микроорганизмы, обладающие широким спектром уже сформированной инвазивной и персистентной активности. Отсутствие корреляций может также указывать на более сложный, нелинейный характер взаимоотношений между биологическими характеристиками возбудителей и иммунным потенциалом больного, который модулируется различными факторами (сопутствующая патология, медикаментозные воздействия и др.), значение которых возрастает при прогрессировании ХОБЛ.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты позволяют расширить представления о механизмах развития и прогрессирования ХОБЛ с

позиций нарушения гомеостаза в экосистеме «микрофлора – макроорганизм» (рисунки 16,17). Хотя табакокурение является основным фактором, ответственным за формирование ХОБЛ, все-таки только у части курильщиков развивается хронический бронхит и ХОБЛ [344]. С другой стороны, для больных ХОБЛ характерна хроническая бактериальная колонизация НДП (как было показано в настоящей работе и других исследованиях), в то время как при отсутствии заболевания трахеобронхиальное дерево остается стерильным (по данным культуральных методов). В связи с этим в настоящее время широко дискутируется роль инфекции в ее взаимоотношениях с защитными системами макроорганизма в генезе ХОБЛ.

На первых этапах формированию микробной персистенции способствуют повреждения реснитчатого эпителия под действием курения, подавляющего мукоцилиарный клиренс. В условиях мукостаза и гиперсекреции слизи нарушается естественное очищение слизистой трахеобронхиального дерева от бактерий, попавших путем микроаспирации (которая присутствует и у здоровых лиц во сне) из ВДП в нижние отделы респираторного тракта. В настоящей работе было установлено, что в составе микробиоценоза отделяемого бронхов при ХОБЛ ведущая роль принадлежит представителям аутохтонной флоры ВДП и условно-патогенным бактериям (стафилококки, энтеробактерии, НГОБ), а выявленное сходство видового состава микрофлоры зева и отделяемого бронхов может указывать на аспирационный путь транслокации возбудителей. При этом нами было показано, что персистентная активность усилена у бактерий, колонизирующих НДП, по сравнению с назо- и орофарингеальной флорой, свидетельствуя о высокой агрессивности микроорганизмов, пролиферирующих и персистирующих в очаге патологического процесса.

Кроме того, курение и вызванный им оксидативный стресс индуцирует клеточную экспрессию молекул адгезии ICAM-3, ICAM-1, что сопровождается усилением высвобождения растворимых форм этих молекул. Недавно М.Л. Шония (2014) показала стимулирующее влияние табачного дыма на сывороточное содержание растворимых молекул адгезии у молодых курильщиков с нормальной

легочной функцией [145]. Усиление адгезивного потенциала способствует рекрутированию лейкоцитов и формированию нейтрофильной инфильтрации легочной ткани, лежащей в основе воспаления при ХОБЛ [241]. Известно, что бактериальные агенты также влияют на экспрессию и шеддинг молекул адгезии, индуцируя приток нейтрофилов. В настоящем исследовании был выявлен более высокий уровень sICAM-1 у больных ХОБЛ с частыми обострениями по сравнению с редкими, а также нарастание содержания sICAM-1 и маркера нейтрофильного воспаления sCD14 в период обострений, которые, как известно из литературных данных, не менее чем в 50% случаев являются инфекционно-зависимыми. Воспалительный ответ на повреждающее действие табакокурения и на внедрение инфекции ведет к дальнейшему нарушению защитных механизмов слизистых. Дегрануляция нейтрофилов и бактериальные продукты вносят вклад в хронизацию воспаления, усиление повреждения легочной паренхимы и обструкции мелких дыхательных путей.

Наряду с этим из литературных источников известно, что курение не только модулирует иммунный ответ, но и влияет на структуру микробиома дыхательных путей [214] и на биологические свойства бактерий (например, на чувствительность к антибиотикам) [146]. Выявленная в настоящей работе положительная корреляционная связь между индексом курения и анти IgM активностью потенциальных патогенов также указывает на возможности модифицирующего действия табачного дыма. Повышение персистентного потенциала способствует развитию бактериальной обсемененности НДП, что подтверждается позитивной корреляционной связью между степенью микробной нагрузки и АИГА бактерий, обнаруженной при обследовании больных ХОБЛ I-II степени тяжести (рисунок 13).

При дальнейшем течении заболевания кумулятивное действие компонентов табачного дыма и хронический воспалительный процесс бронхиального дерева приводят к истощению ряда иммунных механизмов, на что указывает снижение содержания клеточных маркеров (растворимых молекул sCD8, sCD25, суммарных фракций антигенов sCD38 и sCD95), связанное отрицательной корреляцией с индексом курения и тяжестью ХОБЛ. Низкий уровень растворимых молекул CD8,

маркеров цитотоксических лимфоцитов, был ассоциирован с расширением видового разнообразия в составе микробных ассоциаций, как показала корреляционная связь между этими показателями. С другой стороны, настоящая работа продемонстрировала, что при тяжелых степенях бронхиальной обструкции отмечается усиление микробных механизмов защиты от факторов локального иммунитета макроорганизма – лизоцима и IgA, а также расширение спектра АИГА бактерий (рисунки 10-12). Таким образом, оба компонента – ослабление факторов иммунной защиты пациентов и усиление инвазивных и персистентных свойств микрофлоры – вносят свой вклад в нарушение колонизационной резистентности слизистых респираторного тракта при прогрессировании ХОБЛ (рисунок 16). В результате на поздних стадиях ХОБЛ микробный пейзаж характеризуется увеличением количества микробных ассоциаций и полирезистентных штаммов, повышением этиологической роли грамотрицательной микрофлоры (энтеробактерий и НГОВ), как было показано в главе 4. В свою очередь хроническая бактериальная колонизация поддерживает персистирующее воспаление НДП, замыкая «порочный круг» (рисунок 17), что сопровождается нарастанием тяжести бронхообструктивных нарушений, усилением одышки и других симптомов, увеличением частоты обострений ХОБЛ.

Кроме того, микробная колонизация способна оказывать сенсibiliзирующее действие, вызывая гиперреактивность бронхов и способствуя формированию перекрест-синдрома астма-ХОБЛ. Неслучайно отличительными особенностями иммунных нарушений при ранних стадиях данного фенотипа являются признаки ослабления апоптоза иммунных клеток (при повышении содержания антиапоптотического фактора sCD95), сопровождающиеся увеличением маркеров клеточной активации sCD25 и молекул гистосовместимости класса I. Поздние стадии перекрест-синдрома, напротив, характеризуются признаками усиления апоптоза и ослабления клеточных иммунных маркеров.



Рисунок 16. Нарушение баланса в системе «микрофлора - макроорганизм» при прогрессировании ХОБЛ

При обострениях заболевания наблюдается усиление воспалительной активности клеток, что проявляется нарастанием уровней иммунных маркеров (антигенов sCD95, sCD54 суммарного, sCD8, sCD38 суммарного, sCD25, sCD50, sHLA-DR) по сравнению со стабильной фазой. С одной стороны, это усугубляет хроническое воспаление дыхательных путей. С другой стороны, повторные обострения ХОБЛ и применяемая терапия (системные кортикостероиды, антибиотики) ведут к дальнейшему истощению факторов иммунной защиты и снижению содержания маркеров активации клеток sCD25, sCD38 и молекул гистосовместимости I класса, что наблюдалось при фенотипе с частыми обострениями. Нарушения иммунной защиты вносят свой вклад в формирование замкнутого круга, способствуя персистенции инфекции, поддержанию воспаления и прогрессированию ХОБЛ (рисунок 17).

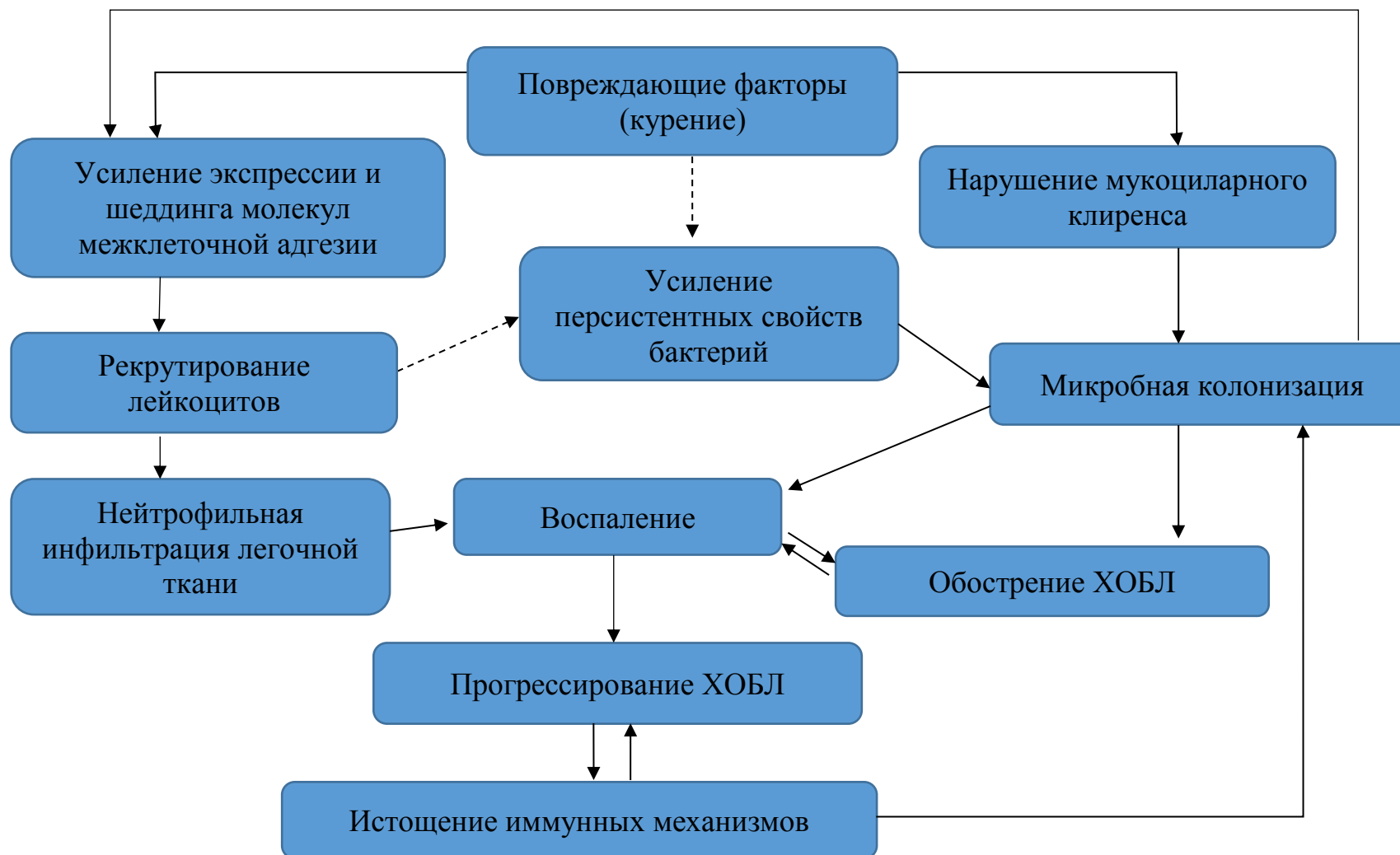


Рисунок 17. Схема патогенеза ХОБЛ с позиций нарушения микробиологического гомеостаза

ГЛАВА 6. ИЗМЕНЕНИЯ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ И БИОМАРКЕРОВ СОСТОЯНИЯ ИММУНИТЕТА ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

В настоящее время обострения ХОБЛ рассматриваются как один из важнейших факторов, определяющих течение и прогноз заболевания, в связи с чем эффективное лечение и профилактика обострений являются первоочередной задачей. Было проведено сравнительное изучение эффективности и безопасности различных методов лечения и профилактики обострений ХОБЛ, а также их влияния на концентрации циркулирующих форм дифференцированных лейкоцитарных антигенов и молекул гистосовместимости.

6.1. Влияние дополнительной терапии рофлумиластом на частоту обострений, функциональные параметры и содержание растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток при хронической обструктивной болезни легких

Современные подходы к лечению ХОБЛ включают контроль воспаления, которое является патофизиологической основой заболевания и играет важную роль при обострениях. Новой опцией патогенетической терапии ХОБЛ стали ингибиторы ФДЭ-4, представителем которых является рофлумиласт. Рофлумиласт уменьшает число обострений при тяжелой ХОБЛ и модифицирует нестабильный фенотип с частыми обострениями, трансформируя его в более стабильный тип. Мишенью ингибиторов ФДЭ-4 являются воспалительные клетки, участвующие в запуске обострений ХОБЛ. В настоящей работе было проведено открытое сравнительное исследование влияния рофлумиласта на клинические показатели, функцию легких и содержание растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток у больных тяжелой/крайне тяжелой ХОБЛ с частыми обострениями при добавлении его к комбинированной терапии иГК+ДДБА+ДДАХ. Обследованные группы были сопоставимы по демографическим данным, исходным клинико-

функциональным характеристикам (таблица 3). Влияние дополнительного лечения рофлумиластом на частоту и длительность обострений показано в таблице 37. В группе, получавшей дополнительную терапию рофлумиластом, количество обострений любой степени тяжести, а также умеренных и тяжелых обострений было меньше, чем в группе сравнения, несмотря на то, что количество пациентов, перенесших хотя бы 1 умеренное или тяжелое обострение, не различалось. Также между группами выявлены различия по средней продолжительности обострения и общему числу дней умеренных или тяжелых обострений в течение года наблюдения. В группе рофлумиласта отмечена тенденция к уменьшению числа госпитализаций по любым причинам.

Таблица 37

Количество и длительность обострений в группах больных ХОБЛ на фоне лечения (Me [0,25p; 0,75p]; M±SD)

Показатели	Рофлумиласт + «тройная» терапия, 25 пациентов	«Тройная» терапия, 17 пациентов	p
Количество обострений (на 1 пациента в год)	2 [1; 3]	3,5 [2,5; 4]	0,012
Количество умеренных и тяжелых обострений (на 1 пациента в год)	1 [0; 3]	2 [1; 3,5]	0,025
Число (%) больных с умеренными и тяжелыми обострениями	15 (60)	13 (76,5)	0,31
Суммарное количество дней умеренных/тяжелых обострений (на 1 пациента в год)	21 [5; 36]	38 [29; 54]	0,043
Продолжительность одного умеренного/тяжелого обострения	10,17±3,18	16,31±3,27	<0,001
Количество госпитализаций (на 1 пациента в год)	1,5 [0; 2]	2 [0,5; 3]	0,067

Динамика выраженности симптомов ХОБЛ исследовалась по оценочному тесту САТ. При анализе данных всех пациентов отмечено снижение балла САТ-теста в течение года с 26,2±4,3 до 22,8±7,9 баллов (p=0,02), однако в отдельных группах изменения были недостоверны (только в группе плацебо отмечалась тенденция к уменьшению балла САТ-теста при p=0,067). Межгрупповых различий

по снижению балла САТ-теста также не было. Динамические изменения показателей ФВД на фоне терапии представлены в таблице 38.

Таблица 38

Изменения постбронходилатационных показателей ФВД в группах больных ХОБЛ на фоне лечения ($M \pm SD$; Me [0,25p; 0,75p])

Показатель, % должного	Рофлумиласт + «тройная» терапия, 25 пациентов			«Тройная» терапия, 17 пациентов		
	До начала лечения	Через 12 месяцев	p	До начала лечения	Через 12 месяцев	p
ОФВ ₁	35,1±11,3	33,1±8,1	0,36	31,4±6,7	25,4±6,6	0,009
ФЖЕЛ	70,9±11,1	66,5±10,1	0,027	71,9±7,4	66,8±8,4	0,007
ОФВ ₁ / ФЖЕЛ, %	49,0±11,7	53,1±8,4	0,72	43,6±9,1	44,4±2,2	0,37
СОС ₂₅₋₇₅	11,9±4,4	11,1±4,3	0,34	11,9±3,8	9,7±3,1	0,007
Изменение ОФВ ₁ , мл/год	18 [-216; 62]			-178 [-256; -128] *		

* $p < 0,05$ при межгрупповом сравнении

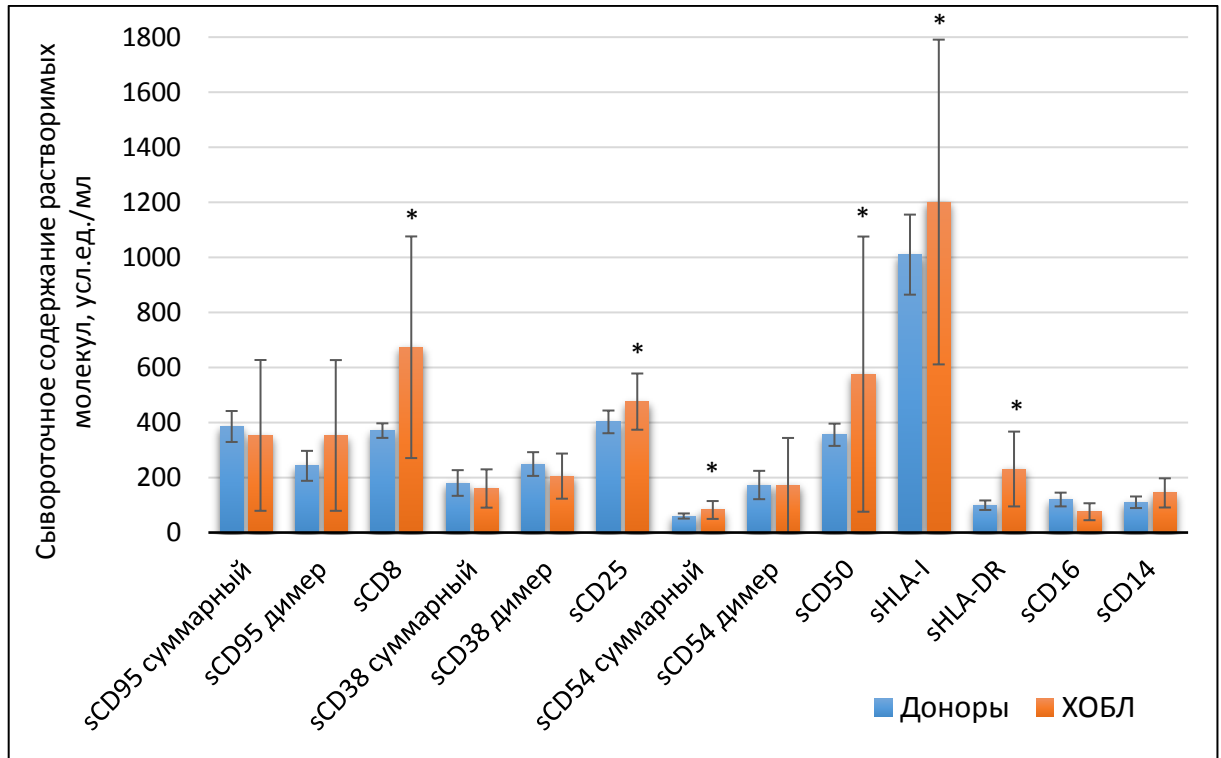
За год наблюдения в обеих группах отмечено снижение ФЖЕЛ, в группе «тройной» терапии также снизились значения ОФВ₁ и СОС₂₅₋₇₅ по сравнению с исходным уровнем. Индивидуальные изменения ОФВ₁ в обеих группах варьировали от быстрого снижения на 200-300 мл/год до повышения вплоть до 90 мл/год. При этом в группе рофлумиласта ОФВ₁ за год, в среднем, практически не изменился, а в группе сравнения зарегистрировано снижение этого показателя (различия между группами достоверны при $p=0,048$). Годовая потеря ОФВ₁ является показателем прогрессирования ХОБЛ и по литературным данным, в среднем, составляет 33 – 69 мл/год. Скорость снижения ОФВ₁ зависит от различных факторов, включая статус и интенсивность курения, исходную легочную функцию, гиперреактивность дыхательных путей, частоту обострений, пол и возраст, наличие эмфиземы и, возможно, другие биологические маркеры и генетические вариации [367]. Включенные в настоящее исследование больные характеризовались низким уровнем ОФВ₁ (<50% от должной величины) и по наиболее значимым параметрам исходных различий между изучаемыми группами не наблюдалось. В группе сравнения у большинства больных отмечены быстрые

темпы снижения ОФВ₁, даже несмотря на интенсивную «тройную» терапию. Добавление рофлумапта, хоть и не улучшило легочные показатели, но все-таки оказало благоприятное влияние на ФВД, способствуя замедлению темпов и предотвращению потери ОФВ₁. Рофлумапт не относится к группе бронходилатирующих препаратов, его влияние на функцию легких носит опосредованный характер и реализуется через подавление воспалительного процесса. Следует отметить, что даже длительное ингаляционное использование кортикостероидов, самых мощных средств с противовоспалительной активностью, не замедляет темпы ежегодного снижения ОФВ₁ при ХОБЛ. В крупномасштабных исследованиях с использованием рофлумапта, в основном, отмечалось его положительное, хоть и не сильно выраженное влияние на показатели ФВД [233, 336].

Различий по частоте серьезных нежелательных явлений между группами не было. При использовании рофлумапта у 2 (8%) больных наблюдались гастроинтестинальные расстройства, которые имели легкую или умеренную выраженность и купировались самостоятельно, что соответствует описанным в литературе данным [87, 230, 242]. Снижение массы тела при приеме рофлумапта наблюдалось у 1 пациента с исходно пониженной массой тела и у 1 больного с ожирением. В группе комбинированной терапии без рофлумапта у 1 больного развилась фибрилляция предсердий и обострение хронической сердечной недостаточности, ассоциированное с обострением ХОБЛ. Пневмоний и летальных исходов в группах не было.

Также была изучена динамика изменений содержания растворимых дифференцировочных антигенов лейкоцитов и молекул гистосовместимости на фоне лечения. Исходно у больных ХОБЛ отмечалось повышение среднего уровня растворимых антигенов sCD8, sCD25, sCD50, суммарного антигена sCD54, молекул sHLA-I и sHLA-DR и тенденция к повышению димера sCD95 ($p=0,063$) по сравнению со здоровыми донорами (рисунок 18). Высокий уровень исследованных антигенов свидетельствовал о недостаточном контроле воспалительного процесса у этих больных. При этом различий по содержанию иммунных биомаркеров между

группами пациентов с комбинированной терапией и с добавлением ингибитора ФДЭ-4 не было.



* $p < 0,05$ при сравнении с донорами

Рисунок 18. Исходное содержание растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов и молекул главного комплекса гистосовместимости в сыворотке больных ХОБЛ и здоровых доноров (М±SD)

Динамические изменения сывороточных концентраций растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов и молекул главного комплекса гистосовместимости на фоне лечения представлены в таблице 39 и на рисунке 19. Однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил снижение содержания молекул sCD8, sCD25, sHLA-DR под воздействием длительной комбинированной терапии иГК+ДДБА+ДДАХ, что отражает противовоспалительные эффекты «тройной терапии». Добавление ингибитора ФДЭ-4 к 3-х компонентной схеме оказывало более широкое влияние на изучаемые биомаркеры. Включение рофлумиласта позволило, наряду с уменьшением концентрации перечисленных антигенов, снизить также уровень суммарных и олигомерных антигенов sCD38, суммарного антигена sCD54, молекул sCD50 и sHLA-I; изменения модулятора апоптоза, суммарного антигена sCD95, находились

в пределах тенденции. Как правило, снижение содержания растворимых дифференцировочных антигенов происходило постепенно, к концу 3-го месяца терапии, после этого стабилизируясь на нормальном или даже низком уровне (рисунок 19).

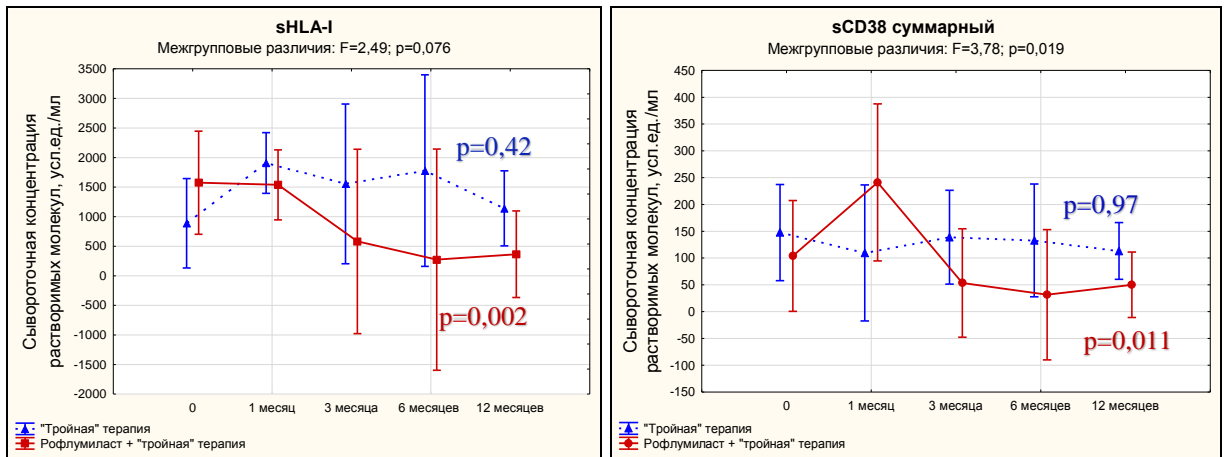


Рисунок 19. Динамические изменения сывороточного содержания иммунных маркеров у больных ХОБЛ под действием терапии (ОДА с повторными измерениями; $M \pm 0,95$ Conf. Interval): А. sHLA-I (внутригрупповые различия достоверны в группе «Рофлумиласт + «тройная» терапия»: $F=11,46$, $p=0,002$; внутригрупповые различия недостоверны в группе «Тройная» терапия: $F=1,05$, $p=0,42$; межгрупповые различия в рамках тенденции: $F=2,49$, $p=0,076$); В. суммарный антиген sCD38 (внутригрупповые различия достоверны в группе «Рофлумиласт + «тройная» терапия»: $F=4,51$, $p=0,011$; внутригрупповые различия недостоверны в группе «Тройная» терапия»: $F=0,13$, $p=0,97$; межгрупповые различия достоверны: $F=3,78$, $p=0,019$)

Противовоспалительное действие рофлумиласта связано с его влиянием на один из ключевых ферментов – ФДЭ 4-го типа, который регулирует метаболизм цАМФ, катализируя его переход в неактивную форму АМФ [316]. ФДЭ-4 содержится во всех провоспалительных и иммунных клетках, что, с одной стороны, делает этот фермент привлекательной мишенью для контроля воспаления при ХОБЛ [87] и, с другой, позволяет объяснить выявленные сдвиги со стороны растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток, участвующих в различных этапах иммунных и воспалительных реакций. При ХОБЛ инфильтрация легочной ткани представлена нейтрофилами, $CD8^+$ лимфоцитами и альвеолярными макрофагами. Молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1, ICAM-3) обеспечивают

рекрутирование нейтрофилов в легочную ткань и также являются биомаркерами активности воспаления. Влияние рофлумаиаста в комплексе с иГК и бронходилататорами (но не трехкомпонентной терапии без рофлумаиаста) на содержание растворимых молекул адгезии ICAM-1 и ICAM-3 характеризует противовоспалительные эффекты и, вероятно, способствует ограничению нейтрофильной инфильтрации. Мишенью для цитотоксических CD8⁺ клеток служат молекулы гистосовместимости I класса. С одной стороны, физиологические эффекты антигена CD8 реализуются при взаимодействии с молекулами HLA-I, с другой стороны, растворимые белки гистосовместимости I класса обладают блокирующим действием в отношении цитотоксических Т-лимфоцитов, инициируя Fas/Apo-1 зависимый апоптоз [355, 365]. В обеих группах назначенная терапия приводила к снижению уровня антигена sCD8, но в группе рофлумаиаста это действие усиливалось влиянием на молекулы sHLA-I, а также на суммарные и олигомерные фракции sCD38. Для молекул CD38 характерны плеiotропные эффекты; они являются фенотипическими маркерами дифференцировки и активации лимфоцитов и мононуклеарных фагоцитов [68]. В последние годы изучение CD38, выполняющего функции эктоэнзима и сигнальной молекулы, принесло новые данные о регуляции Ca⁺⁺ сигналинга и метаболизма пиридиновых оснований с последующим влиянием на иммунные функции [114].

Таким образом, рофлумаиаст в качестве дополнительной терапии играет важную роль в профилактике обострений ХОБЛ, усиливая противовоспалительный потенциал «тройной» ингаляционной терапии, что подтверждается не только изменениями клинико-функциональных параметров, но и динамикой содержания биомаркеров воспаления – растворимых форм молекул межклеточной адгезии sCD50 и sCD54, активационных молекул лимфоцитов sCD38 и молекул главного комплекса гистосовместимости I класса. При этом, как было показано в главе 3, нарастание уровня маркеров состояния иммунитета при стабильной ХОБЛ свидетельствует о недостаточной эффективности противовоспалительной терапии и может рассматриваться как дополнительное показание к назначению ингибитора ФДЭ-4.

Таблица 39

Изменения содержания растворимых дифференцировочных антигенов у больных ХОБЛ на фоне лечения (M±SE)

Группы Антигены	Рофлумиласт + «тройная» терапия						«Тройная» терапия					
	0	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	р ₀	0	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	р ₀
sCD95 сумм.	199±25	1146±489	225±15	233±89	198±48	0,059	391±178	291±28	240±38	197±56	190±24	0,482
sCD95 димер	246±16	546±280	134±51	96±11	92±2	0,144	473±217	251±15	200±74	252±101	186±41	0,295
sCD8	455±11	611±248	205±227	83±28	51±4	0,039	893±304	542±192	170±60	180±84	127±24	0,026
sCD38 сумм.	104±16	241±89	54±23	32±4	50±4	0,043	148±44	110±9	139±41	133±53	113±26	0,844
sCD38 димер	172±29	300±18	129±54	67±19	65±15	0,006	209±39	149±22	356±225	255±118	161±64	0,605
sCD25	419±10	648±130	227±96	153±6	157±5	0,006	453±36	803±345	181±21	189±29	201±19	0,042
sCD54 сумм.	61±2	109±34	34±15	46±24	23±4	0,04	86±26	64±2	47±18	27±5	32,1±7	0,066
sCD54 димер	94±12	430±306	68±34	32±5	33±9	0,276	227±137	107±18	191±99	201±104	112±50	0,585
sCD50	306±20	760±263	176±73	112±3	151±22	0,031	906±377	664±320	157±17	153±17	206±33	0,137
sHLA-I	1574± 143	1539± 202	583± 269	274± 61	365± 108	0,002	889± 366	1908± 214	1555± 651	1780± 813	1141± 309	0,42
sHLA-DR	212±65	223±58	45±58	28±65	39±75	0,084	250±52	284±59	81±52	60±52	40±52	0,016
sCD16	79±14	55±15	49±1	48±6	105±57	0,539	67±16	73±10	66±6	70±13	180±68	0,164
sCD14	134±25	109±11	83±8	80±12	87±12	0,917	162±22	159±16	158±2	207±19	147±11	0,172

Примечание: сумм. – суммарный

6.2. Изменения клинико-функциональных параметров и сывороточного содержания иммунных биомаркеров при лечении обострений хронической обструктивной болезни легких

6.2.1. Влияние небулизированного будесонида на клинико-функциональные параметры и сывороточное содержание растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов при обострении хронической обструктивной болезни легких

Актуальной проблемой пульмонологии является как профилактика, так и лечение обострений ХОБЛ, особенно тяжелых, которые ассоциируются с летальностью, ухудшением функции легких, риском госпитализации, снижением качества жизни [248]. В период обострений максимальной выраженности достигает воспаление, лежащее в основе развития ХОБЛ [204], поэтому обязательным компонентом лечения умеренных и тяжелых обострений ХОБЛ является противовоспалительная терапия системными глюкокортикоидами, альтернативой которым может служить использование небулизированного будесонида [131, 248].

В настоящей работе проведено открытое сравнительное рандомизированное исследование эффективности и безопасности небулизированного будесонида и преднизолона при лечении обострения ХОБЛ, а также изучение их влияния на сывороточную концентрацию растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток. Демографические данные, статус курения, сопутствующая патология и терапия больных в сравниваемых группах были представлены в главе 2 (таблица 4); по данным параметрам группы были сопоставимы. Динамика клинико-лабораторных данных на фоне лечения показана в таблице 40. Выраженность клинической симптоматики в группах до начала лечения отличалась незначительно. Проводимая терапия в обеих группах привела к положительной клинической динамике: уменьшению одышки, кашля, продукции и гнойности мокроты, также снизился балл САТ-теста, количество хрипов в легких и СОЭ (таблица 40). Использование преднизолона привело к нарастанию уровня нейтрофильных лейкоцитов крови, что связано с особенностями его действия на пул циркулирующих лейкоцитов. При этом была выявлена положительная

корреляционная связь между приростом количества лейкоцитов крови и дозой ($r=0,42$; $p=0,045$), а также длительностью терапии сГК ($r=0,44$; $p=0,026$).

Таблица 40

Изменение симптомов в процессе лечения обострения ХОБЛ ($M \pm SD$)

Симптомы \ Группы больных	Будесонид (24 больных)			Преднизолон (36 больных)		
	До лечения	После лечения	p_1	До лечения	После лечения	p_2
САТ-тест (балл)	22,2±4,4	17,2±4,0	0,02	25,6±3,2*	16,8±3,4	<0,001
Кашель (балл)	3,6±0,9	2,1±1,0	0,02	3,7±0,8	1,8±0,7	0,002
Одышка (балл по mMRC)	3,0±0,7	1,8±0,4	0,02	3,4±0,8	2,0±0,7	0,03
ЧДД (в мин)	23,0±5,2	19,2±1,7	0,06	24,8±3,8	19,4±2,8	0,02
Хрипы в легких (балл)	2,5±0,4	1,0±0,5	0,005	2,9±0,5*	1,5±1,0*	0,002
SpO ₂ (%)	94,4±2,3	97,7±0,5	0,01	93,4±1,5	96,9±1,6	0,003
Количество нейтрофилов в мокроте	65±9	18±10	0,001	58±6	32±11*	0,001
Лейкоциты крови, $\times 10^9/\text{л}$	5,9±2,3	6,4±2,8	0,23	9,6±1,9*	14,9±8,8*	0,032
- нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$	4,4±2,3	3,6±1,5	0,77	9,3±7,6*	11,7±8,1*	0,045
- лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,0±0,9	1,9±1,0	0,34	1,9±0,7	2,36±1,1	0,033
СОЭ, мм/ч	20±10	15±5	0,01	21±18	11±7*	0,007
Глюкоза крови, ммоль/л	4,7±1,7	5,0±2,5	0,11	5,4±2,4	6,5±3,0*	0,004

* $p < 0,05$ между группами

Исходные показатели ФВД (ОФВ₁, ЖЕЛ, ФЖЕЛ) не отличались в сравниваемых группах, за исключением индекса Тиффно и мгновенных объемных скоростей, которые у больных в группе будесонида были выше (таблица 41). На фоне лечения в обеих группах отмечалось увеличение ОФВ₁, хотя средний прирост этого показателя в группе преднизолона (276 [155; 320] мл) проявлял тенденцию к более высоким значениям, чем в группе небулизированного будесонида (210 [105; 260] мл), при $p=0,06$. При терапии преднизолоном достоверно выросли также ФЖЕЛ и индекс Тиффно.

Изменения ФВД в процессе лечения обострения ХОБЛ (Ме[0,25p;0,75p])

Показатель и ФВД, % должного	Будесонид (24 больных)			Преднизолон (36 больных)		
	До лечения	После лечения	p	До лечения	После лечения	p
ЖЕЛ	62[56; 68]	63[54;71]	0,61	64 [55; 74]	69[57; 80]	0,49
ФЖЕЛ	59[31; 68]	66[32;74]	0,07	61[33; 72]	68[48; 75]	0,04
ОФВ ₁	54[37; 65]	63[41;77]	0,04	50 [34; 67]	62[37; 79]	0,04
Индекс Тиффно, %	64[51; 75]	67[58;74]	0,22	51[34; 68]*	55[44; 60]*	0,04
ПОС	27[17;57]	36[24;52]	0,29	30[21;44]	31[24;48]	0,5
МОС ₂₅₋₇₅	19[17;78]	42[17;81]	0,29	18 [12;25]	15[12;25]*	0,14
МОС ₂₅	44[23; 67]	45[22;89]	0,79	30 [21;31]*	29[14;34]*	0,89
МОС ₅₀	38[14; 61]	43[13;72]	0,67	20 [10;28]*	25[11;29]*	0,07
МОС ₇₅	29[20; 40]	37[20;54]	0,07	18 [8; 21]*	21[16;28]*	0,07

*p<0,05 между группами

Сатурация кислорода в обеих группах исходно была ниже 95%, что соответствовало дыхательной недостаточности I степени. Динамика SpO₂ представлена на рисунке 20. На фоне лечения зарегистрирован достоверный прирост насыщения кислородом в обеих группах (будесонид: F=6,74; p=0,0001; преднизолон: F=4,21; p=0,003), различий между группами по динамике SpO₂ не было (F=1,62; p=0,147).

Длительность стационарного лечения составила 11,3±1,7 дней в группе будесонида и 12,0±1,5 дней в группе преднизолона, различия между группами находились в рамках статистической тенденции (p=0,098). Большинство больных в обеих группах были выписаны с улучшением. Клиническое ухудшение (на фоне присоединившейся острой респираторной вирусной инфекции) зарегистрировано у 3 больных в группе иГК и у 1 больного в группе сГК (различия частот не достоверны). Необходимость в повторной госпитализации в течение следующих 2-х месяцев по поводу обострения ХОБЛ возникла у 2 больных, которые лечились небулизированным будесонидом (различия между группами не достоверны).

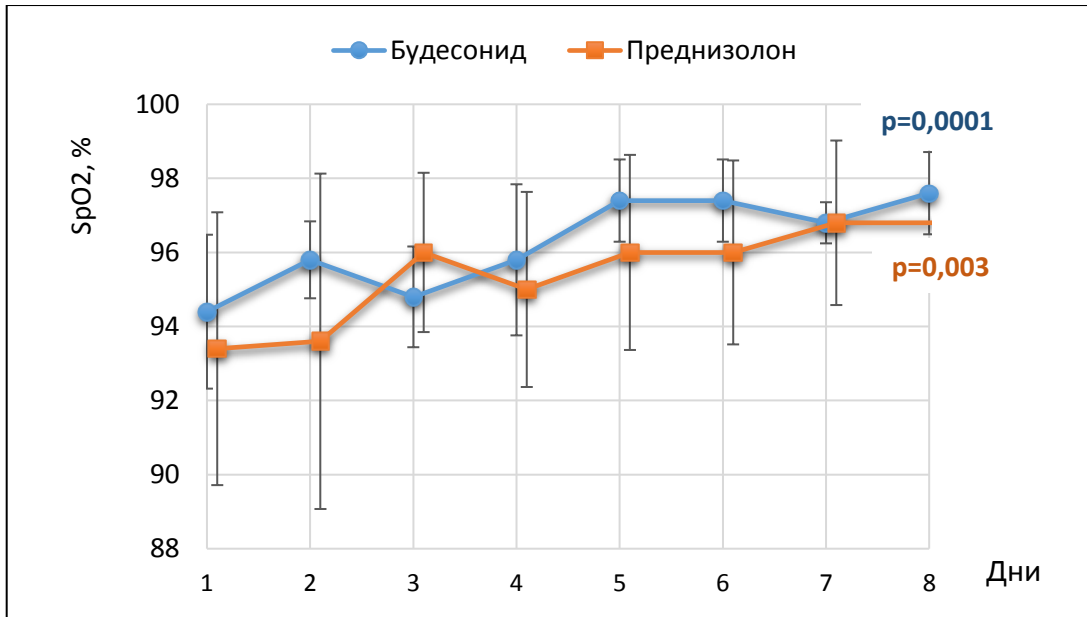


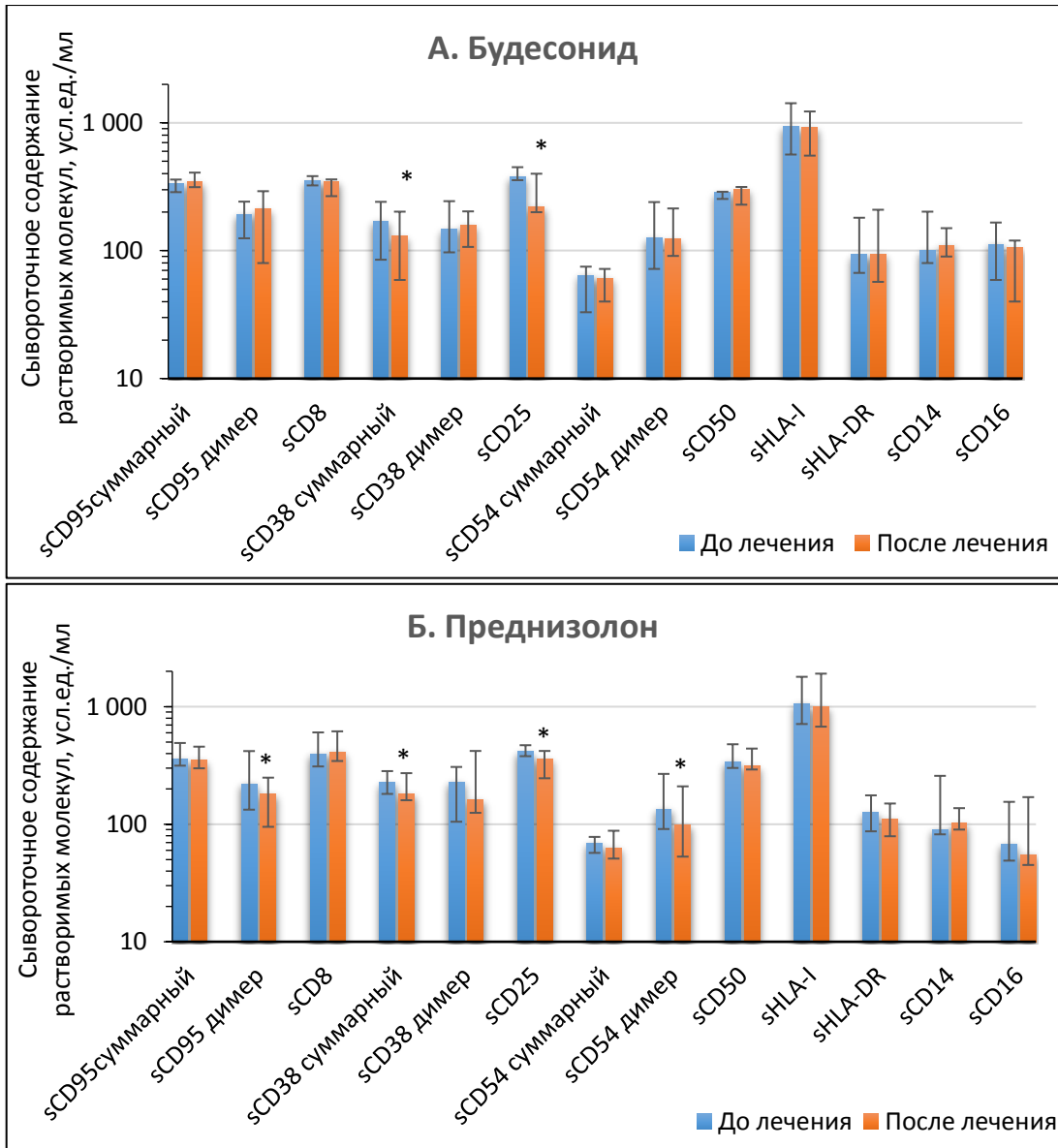
Рисунок 20. Динамические изменения SpO₂ у больных с неосложненным обострением ХОБЛ в процессе лечения (ОДА с повторными измерениями; $M \pm 0,95$ Conf. Interval)

Также были изучены побочные действия кортикостероидной терапии. В группе иГК, в основном, встречались местные нежелательные явления (сухость во рту, охриплость голоса), а также у 3 больных наблюдались тремор и повышение артериального давления. В группе сГК отмечалось повышение АД, гипергликемия, диспепсии, нарушения сна, возбуждение, тремор. При лечении преднизолоном гипергликемия встречалась в 4,6 раз чаще по сравнению с небулизированным будесонидом (19,4% и 4,2% соответственно; $p=0,089$). Также после курса преднизолона отмечено увеличение среднего уровня глюкозы крови по сравнению с исходным (таблица 40).

В настоящей работе впервые была проведена комплексная оценка эффектов кортикостероидов, включая их влияние не только на клинико-функциональные параметры, но и на молекулярные маркеры клеточного иммунитета и системного воспаления. Как было показано ранее, содержание тестируемых молекул в сыворотке повышается в период обострения по сравнению со стабильной фазой, хотя степень этого подъема может быть различной, и уровень маркеров не всегда выходит за границы контрольных значений. У больных с обострением ХОБЛ, включенных в данное исследование, исходный уровень суммарного антигена

sCD38 и молекул sHLA-DR был выше контрольных значений ($p < 0,05$), также наблюдалась тенденция к повышению антигена sCD25 ($p = 0,09$). Концентрации антигена sCD50, димерных фракций sCD38 и sCD95 до начала лечения у всех пациентов были снижены ($p < 0,05$ при сравнении с донорами), а уровень олигомера sCD54 обнаруживал тенденцию к снижению ($p = 0,06$ при сравнении с донорами). Изменения концентраций растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов в процессе лечения обострения ХОБЛ представлены на рисунке 21. При лечении кортикостероидами в обеих группах отмечалось уменьшение сывороточной концентрации маркеров активации иммунных клеток антигенов sCD25 и sCD38 суммарного, что свидетельствует о противовоспалительной активности, которую проявляли как системные, так и локальные кортикостероиды. Использование преднизолона привело, кроме того, к угнетению олигомерных фракций sCD54 и sCD95; также отмечалась тенденция к снижению содержания суммарного sCD95 антигена ($p = 0,09$) и антигена sCD50 ($p = 0,09$). Уменьшение сывороточной концентрации антигена sCD50 было связано с дозой ($r = -0,76$; $p = 0,01$) и длительностью ($r = -0,68$; $p = 0,04$) терапии преднизолоном. У пациентов, получавших будесонид, статистически значимых изменений в уровне данных антигенов выявлено не было.

Изучение эффективности и безопасности небулизированного будесонида показало, что он не уступал преднизолону по влиянию на основной спирометрический показатель тяжести бронхиальной обструкции – $ОФВ_1$, на клинические симптомы и сатурацию O_2 . Эти данные согласуются с результатами других авторов, которые применяли небулизированный будесонид при обострениях бронхиальной астмы [79, 335] и ХОБЛ [80, 211, 376, 382]. Вместе с тем необходимо отметить, что в настоящем исследовании преднизолон оказал более выраженное влияние на результаты спирометрии, что проявлялось в тенденции к более высокому приросту $ОФВ_1$ в группе сГК по сравнению с группой будесонида, а также в положительных изменениях других показателей, характеризующих ограничение скорости воздушного потока, а именно ФЖЕЛ и индекса Тиффно.



* $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем

Рисунок 21. Сывороточное содержание растворимых дифференцировочных антигенов и молекул главного комплекса гистосовместимости и его изменения при терапии глюкокортикоидами: А. Будесонид, Б. Преднизолон (Me[0,25p;0,75p])

Это указывает на более высокую эффективность преднизолона у некоторых пациентов, что может быть особенно важным при тяжелом обострении ХОБЛ с угрозой респираторной недостаточности, требующей вентиляционной поддержки и перевода в отделение реанимации и интенсивной терапии. Кроме того, повысить эффективность иГК можно путем увеличения дозы или частоты введения будесонида. С другой стороны, необходимо учитывать, что повторные курсы сГК, которые требуются больным с частыми обострениями, создают дополнительный

риск, особенно у пациентов с сопутствующей патологией, поскольку чреваты побочными действиями, зависящими от кумулятивной дозы [307, 389]. В отличие от преднизолона небулизированный будесонид показал более благоприятный профиль безопасности, в частности, по влиянию на углеводный обмен, что согласуется с результатами других авторов [363, 376].

Известно, что кортикостероиды оказывают прямое ингибирующее действие на клетки, участвующие в воспалении, и тормозят высвобождение воспалительных медиаторов и цитокинов [185]. Одним из механизмов противовоспалительного действия глюкокортикоидов является их действие на интерлейкин-2 и его рецептор CD25. Функционирование системы – интерлейкин-2/рецептор интерлейкина-2 – является решающим моментом в запуске пролиферации Т-лимфоцитов и индукции иммунного ответа [76]. В обеих группах было зарегистрировано уменьшение концентрации растворимых форм CD25, что, видимо, отражает изменение уровня мембранной экспрессии рецептора и является проявлением противовоспалительного действия кортикостероидов. Снижение продукции интерлейкина-2 и его рецептора под действием стероидных гормонов ведет к уменьшению интерлейкин-2 зависимого фосфорилирования белков и подавлению пролиферации Т-лимфоцитов. Также под действием как преднизолона, так и будесонида нормализовалось повышенное содержание растворимых молекул CD38, которые играют важную роль в процессах клеточной адгезии, трансдукции сигналов и мобилизации кальция в гладкой мускулатуре бронхов, обуславливающей бронхиальную обструкцию. Ранее другими исследователями было обнаружено индуцированное кортикостероидами снижение мембранной экспрессии антигенов CD38 [321]. Видимо, снижение мембранной экспрессии молекул CD38 сопровождается уменьшением сплайсинга и высвобождения их растворимых форм. Угнетающее влияние преднизолона на уровень растворимых антигенов sCD25, sCD38 и других маркеров воспаления (интерлейкина-5, эозинофильного катионного белка) было выявлено ранее и при лечении бронхиальной астмы [232]. При этом важными свойствами современных ИГК являются их высокая местная противовоспалительная активность и низкое

системное действие, что может объяснить отсутствие сдвигов со стороны других растворимых дифференцировочных молекул в сыворотке крови после короткого курса небулизированного будесонида у обследованных больных.

В отличие от иГК преднизолон оказывал неселективное угнетающее действие и на другие циркулирующие дифференцировочные молекулы лейкоцитов, в том числе на те, исходное содержание которых было низким. Использование сГК усугубило существующие нарушения в сети молекул адгезии, обусловив дальнейшее снижение уровня растворимых форм олигомерной фракции антигена ICAM-1 (CD54), который обеспечивает миграцию лейкоцитов в легкие и участвует в формировании нейтрофильного воспаления при ХОБЛ [160]. Выявленный низкий сывороточный уровень этих молекул может отражать угнетение их мембранной экспрессии под влиянием сГК, что ведет к ослаблению активности межклеточных взаимодействий в процессе реализации иммунного ответа. Полученные результаты согласуются с данными современной литературы, которые показали снижение мембранной экспрессии молекул адгезии под воздействием оральных кортикостероидов [267]. По экспериментальным данным снижение экспрессии молекул адгезии эпителием дыхательных путей приводит к колонизации легких оппортунистической микрофлорой и повышению риска пневмоний [228]. Индуцированные сГК нарушения адгезии могут быть ответственны и за перераспределение нейтрофилов в сосудах, заключающееся в уменьшении краевого стояния нейтрофилов с ослаблением их транспозиции через сосудистую стенку и миграции в ткани, и в увеличении циркулирующего пула, которое приводит к появлению нейтрофильного лейкоцитоза в общем анализе крови, что и наблюдалось в группе преднизолона. Следует отметить, что угнетение молекул адгезии под действием преднизолона носит дозозависимый характер.

Также кортикостероиды способны вызывать апоптоз незрелых или активированных Т- и В-лимфоцитов. Растворимые формы Fas белка (sCD95) блокируют апоптоз, связываясь с Fas-лигандом на поверхности клеток; олигомерные формы sCD95 действуют цитотоксически [305]. В проведенном исследовании назначение иГК не меняло содержания модулятора апоптоза, но

применение преднизолона приводило к дальнейшему снижению концентрации олигомерной фракций sCD95. Низкий уровень ингибитора апоптоза способствует усилению запрограммированной гибели иммунокомпетентных клеток. Одним из путей реализации иммунодепрессивных эффектов кортикостероидов является контроль абсолютного количества лимфоидных клеток и их субпопуляций, который обеспечивается активацией Fas(CD95) - зависимого апоптоза. При назначении преднизолона уменьшение концентрации модулятора апоптоза sCD95 сопровождалось одновременным снижением уровня активационных молекул лимфоцитов – антигенов sCD25 и sCD38.

Другие препараты, используемые в лечении ХОБЛ (фенотерол, тиотропий, амброксол, макролиды), также способны влиять на уровень мембранной экспрессии молекул адгезии [169, 229, 265, 270]. Однако различий по частоте использования этих препаратов между сравниваемыми группами не было.

Вышесказанное позволяет говорить об иммуносупрессивных эффектах сГК, которые хорошо известны в клинической практике и могут быть выявлены на тонком молекулярном уровне при изучении растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы. В отличие от преднизолона будесонид не вызывал иммунодепрессии. И, хотя по данным мета-анализов длительное использование иГК при ХОБЛ повышает риск пневмоний [272], короткий курс небулизированного будесонида не был ассоциирован ни с клиническими проявлениями иммуносупрессии, ни с угнетением молекулярных маркеров. Выявленные особенности действия небулизированного будесонида наиболее важны для коморбидных и иммунокомпроментированных пациентов, для фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями, требующими назначения кортикостероидов. При лечении сГК целесообразно осуществлять мониторинг состояния иммунитета (включая контроль растворимых дифференцировочных антигенов).

Таким образом, небулизированный будесонид представляет собой эффективную и безопасную альтернативу преднизолону при обострении ХОБЛ. Будесонид обеспечивает повышение ОФВ₁, сатурации O₂ и улучшение

клинической симптоматики, сопоставимое с действием сГК, и при этом реже ассоциируется не только с развитием гипергликемии, но и угнетением растворимых дифференцировочных лейкоцитарных антигенов. Одним из механизмов противовоспалительного действия небулизированного будесонида является его влияние на растворимые формы антигена CD25, рецептора к интерлейкину-2 и активационных молекул лимфоцитов sCD38. Для системных ГК характерно выраженное иммуносупрессивное действие, которое на молекулярном уровне проявляется значительным снижением сывороточной концентрации растворимых молекул адгезии sCD54 и ингибитора апоптоза sCD95, усугубляющим существующие иммунные нарушения.

6.2.2. Влияние неинвазивной механической вентиляции легких на клиничко-функциональные параметры и сывороточное содержание растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов при обострении хронической обструктивной болезни легких, осложненном острой дыхательной недостаточностью

Лечение тяжелых обострений ХОБЛ, осложненных острой дыхательной недостаточностью, является чрезвычайно важной задачей, так как именно они являются основной респираторной причиной летальности больных ХОБЛ [7]. В настоящее время оптимизация ведения таких больных связана с включением в схемы терапии неинвазивной вентиляции легких (НВЛ), которая сегодня активно применяется не только в реанимации, но и в отделениях общетерапевтического и пульмонологического профиля [11, 81, 385].

В открытом сравнительном исследовании в условиях пульмонологического отделения было изучено влияние неинвазивной механической вентиляции легких на функциональные и иммунные показатели больных с тяжелым обострением ХОБЛ, осложненным дыхательной недостаточностью. Различий по демографическим и клиничко-функциональным характеристикам включенных пациентов в сравниваемых группах не было (таблица 5).

Исходные показатели ФВД и сатурации кислорода и их динамика в процессе лечения представлены в таблице 42. Исходно большинство пациентов, включенных в исследование, характеризовались тяжелыми обструктивными и рестриктивными нарушениями. На фоне проводимой терапии основная масса больных демонстрировала достоверное улучшение состояния и уменьшение одышки. Увеличение ОФВ₁ было зарегистрировано в обеих группах, однако в основной группе средний прирост ОФВ₁ был в 3 раза выше, чем в группе стандартной терапии (416 [157; 770] мл и 141 [96; 175] мл, соответственно, $p < 0,001$). Кроме того, на фоне дыхательной поддержки установлено повышение ФЖЕЛ и ПОС.

Таблица 42

Динамика параметров ФВД (постбронходилатационные показатели) и сатурации кислорода на фоне лечения ($M \pm SD$; $Me[0,25p; 0,75p]$)

Показатели	НВЛ + стандартная терапия (n=30)			Стандартная терапия (n=24)		
	До лечения	После лечения	p	До лечения	После лечения	p
ФЖЕЛ, % должного	45,8±15,3	56,3±23,8	0,023	43,5±19,5	45,2±18,0	0,214
ОФВ ₁ , % должного	39,4±18,5	51,5±26,4	0,007	28,1 [19,2; 44,3]	31,2 [22,7; 48,8]	0,007
ПОС, % должного	31,1±13,7	45,8±23,9	0,009	31,8±13,1	35,0±11,4	0,345
SpO ₂ , %	90,0±4,6	96,7±2,1	<0,001	93[92;96]	98[96;98]	0,018

Изменения сатурации кислорода в процессе лечения у пациентов обеих групп показаны на рисунке 22. Достоверный прирост SpO₂ выявлен в обеих группах (НВЛ+стандартная терапия: $F=5,79$; $p=0,0001$; стандартная терапия: $F=8,54$; $p < 0,0001$). Однако, скорость подъема SpO₂ была различной. В группе больных, получавших стандартную терапию без НВЛ, достоверное увеличение сатурации по сравнению с исходными значениями наблюдалось только на 4-й день лечения ($p_{1-2 \text{ день}} = 0,153$; $p_{1-3 \text{ день}} = 0,091$; $p_{1-4 \text{ день}} = 0,029$). При проведении НВЛ SpO₂ повышалась сразу же ($p_{1-2 \text{ день}} = 0,047$) и продолжала оставаться на более высоком уровне по сравнению с исходным.

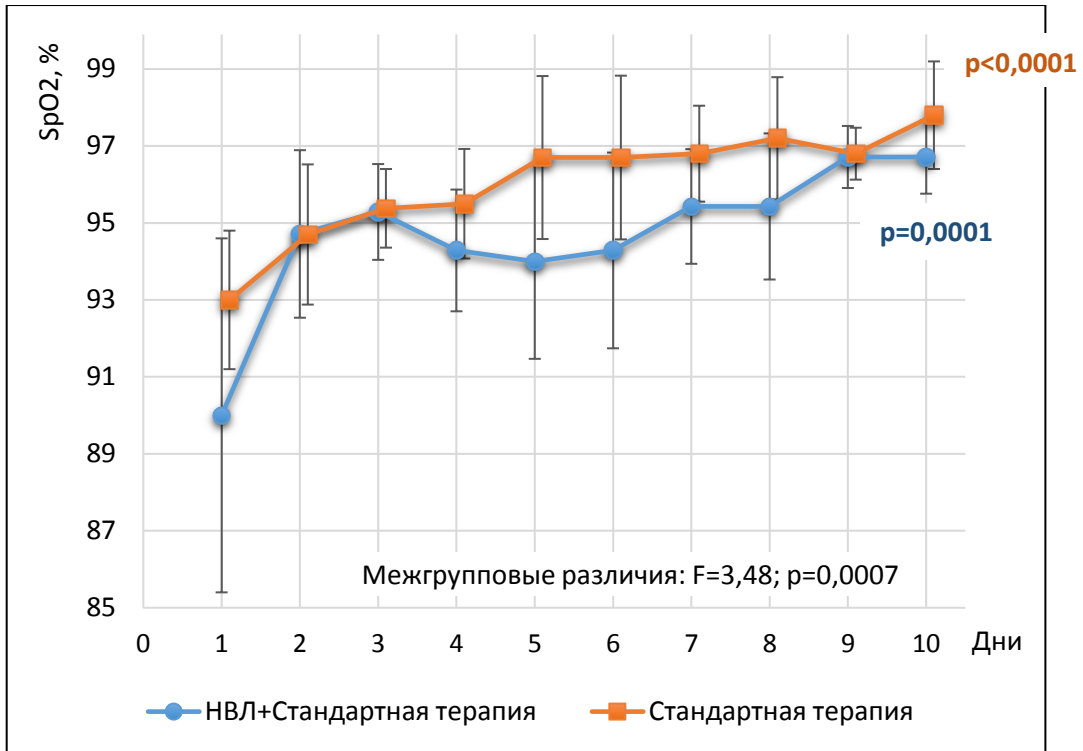
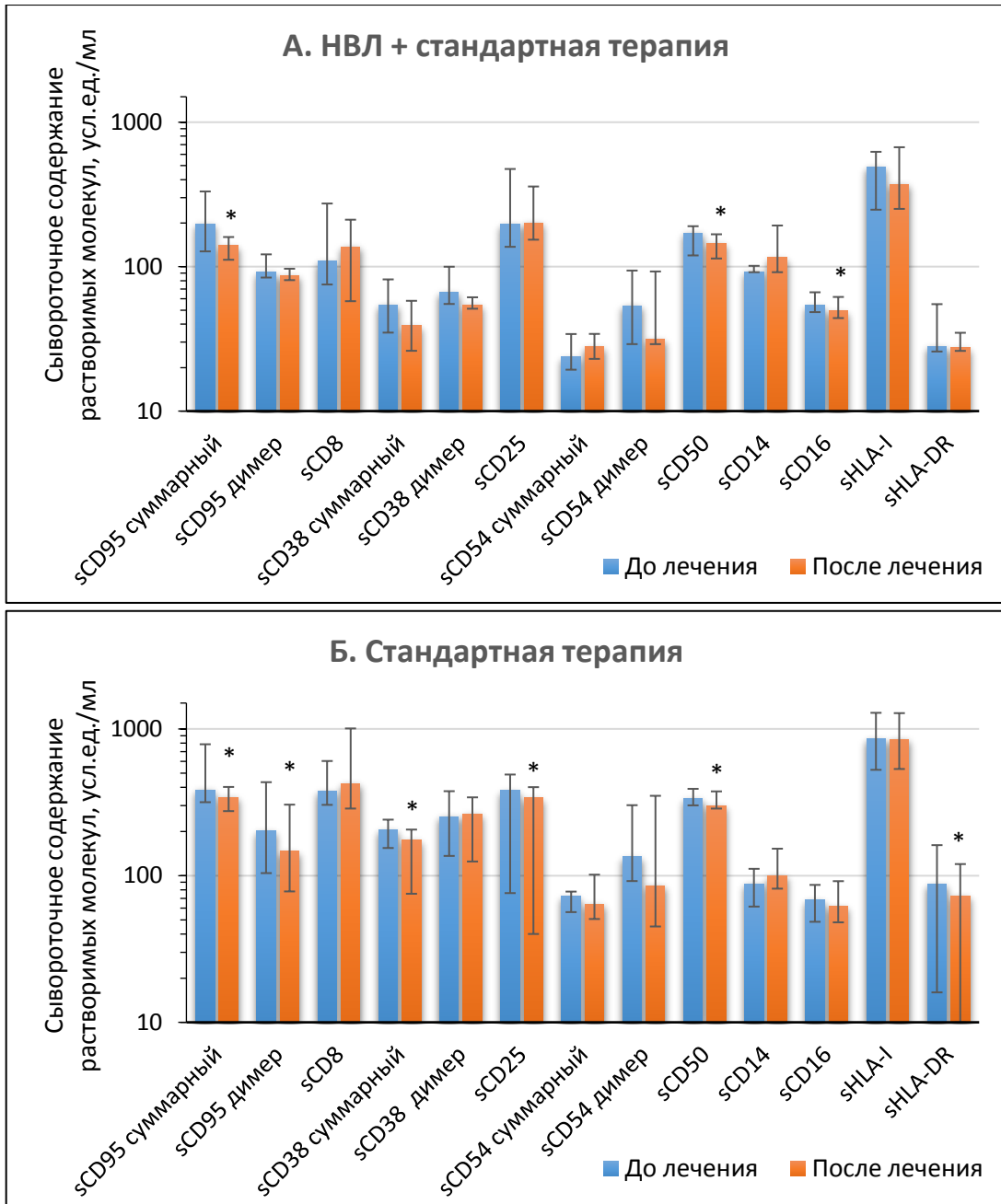


Рисунок 22. Динамические изменения сатурации кислорода у больных с тяжелым осложненным обострением ХОБЛ в процессе лечения (ОДА с повторными измерениями; $M \pm 0,95$ Conf. Interval)

Результаты изучения показателей иммунного статуса в динамике на фоне терапии с использованием НВЛ представлены на рисунке 23. Терапия обострения ХОБЛ с включением НВЛ приводила к нормализации уровня ингибитора апоптоза – суммарного антигена sCD95 ($p=0,038$), растворимых форм молекул межклеточной адгезии CD50 ($p=0,016$) и маркеров натуральных киллеров CD16 ($p=0,037$); изменения олигомерных фракций антигенов sCD95 и sCD38 находились в пределах статистической тенденции ($p=0,086$ и $p=0,085$, соответственно). На фоне стандартной терапии отмечался более широкий спектр изменений: уменьшение концентраций 6 из 13 исследованных молекул: суммарного и олигомерного sCD95 антигена ($p=0,004$ и $p=0,002$ соответственно), суммарного антигена sCD38 ($p=0,005$), антигенов sCD25 ($p=0,008$), sCD50 ($p=0,004$), sHLA-DR ($p=0,013$), и тенденция к снижению димера sCD54 ($p=0,069$).



* $p < 0,05$ при сравнении с исходным уровнем

Рисунок 23. Изменения сывороточного содержания растворимых дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости на фоне терапии осложненного обострения ХОБЛ: А. НВЛ + стандартная терапия, Б. стандартная терапия (представлены Me[0,25p;0,75p])

Все больные были выписаны с клиническим улучшением; ухудшения состояния и летальных исходов не было. Нежелательных явлений, связанных с применением НВЛ, и отказов пациентов от продолжения терапии не зарегистрировано. Продолжительность госпитализации при использовании НВЛ была ниже, чем в группе сравнения ($13,3 \pm 1,9$ дней и $14,4 \pm 2,1$ дней соответственно,

$p=0,043$). Включение НВЛ в лечение обострений ХОБЛ позволило уменьшить как длительность терапии сГК, так и их суточные дозировки, что привело к снижению на 36% курсовой дозы внутривенного дексаметазона по сравнению с группой стандартной терапии ($85,4\pm 37,7$ мг и $115,5\pm 34,3$ мг, соответственно; $p=0,02$).

Неинвазивная механическая вентиляция легких является важным шагом в лечении тяжелых обострений хронической обструктивной болезни легких, снижая потребность в эндотрахеальной интубации, тем самым сокращая осложнения и больничные расходы, а также улучшая выживаемость [234]. Использование НВЛ позволяет решить главные задачи респираторной поддержки: улучшить газообмен, разгрузить дыхательную мускулатуру, уменьшить нарушения дыхания. Сегодня НВЛ рассматривается как часть стандартной терапии обострения ХОБЛ для пациентов, у которых на фоне медикаментозной терапии сохраняется респираторный ацидоз или тяжелая одышка с клиническими признаками усиления работы дыхания или утомления дыхательной мускулатуры [210].

Проведенное исследование показало эффективность и безопасность применения НВЛ в терапевтической клинике в условиях пульмонологического отделения. Использование неинвазивной респираторной поддержки в комплексной терапии обострения ХОБЛ оказало положительный эффект на клинические показатели, ФВД и сатурацию кислорода, причем влияние на спирометрические параметры было более выраженным по сравнению со стандартной медикаментозной терапией. Эти данные подтверждают результаты, полученные ранее другими исследователями [55, 213, 339].

Положительная динамика клинических данных, ФВД и сатурации кислорода при использовании неинвазивной вентиляционной поддержки сопровождалась изменениями сывороточного содержания растворимых дифференцировочных молекул лейкоцитов. Терапия с использованием НВЛ приводила к достоверному снижению концентрации растворимого суммарного антигена sCD95 и тенденции к уменьшению его олигомерной фракции. Снижение уровня ингибитора апоптоза sCD95 сопровождается усилением CD95(Fas/APO-1)-зависимого апоптоза в лимфоцитах, что является одним из механизмов контроля пула активированных в

ходе воспалительного ответа лимфоцитов. По данным А.В. Алясовой и др. (2006), уменьшение сывороточного содержания антигена sCD95 отмечалось на фоне противоопухолевой терапии, и было ассоциировано с более благоприятными исходами заболевания [28]. Кроме того, в основной группе нами было отмечено снижение содержания растворимых форм антигена CD50, относящегося к семейству молекул межклеточной адгезии, которые обеспечивают начальный этап миграции нейтрофилов в легочную ткань и играют важную роль в развитии воспалительного ответа [106, 241]. Помимо этого, включение неинвазивной респираторной поддержки в терапию обострений ХОБЛ сопровождалось изменениями концентрации растворимых форм CD16, маркера натуральных киллеров – NK-клеток. Связывание антигена CD16 с Fc фрагментом иммуноглобулинов класса G ведет к активации NK-клеток и осуществлению антитело-зависимой клеточной цитотоксичности. Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, которые у больных с обструктивными заболеваниями легких обнаружили изменения антигенных детерминант CD16 и CD95 в зависимости от фазы заболевания и проводимой терапии [115]. Уменьшение сывороточных концентраций молекул sCD16 и sCD50, а также модулятора апоптоза sCD95 можно рассматривать как результат противовоспалительного действия комплексной терапии с использованием НВЛ. В группе сравнения обнаружено более широкое влияние на исследуемые биомаркеры: снижение содержания целого ряда растворимых антигенов (обеих фракций sCD95, суммарного sCD38, антигенов sCD25, sCD50, sHLA-DR) и тенденция к уменьшению олигомера sCD54, что может быть обусловлено большей длительностью терапии и более высокой суммарной дозой системных стероидных гормонов, которые оказывают неселективное ингибирующее действие как на иммунопатологические, так и на защитные механизмы. Причем, как было установлено ранее, эти эффекты сГК являются дозозависимыми. Противовоспалительное и иммуносупрессивное действие кортикостероидов обусловлено влиянием на различные компоненты специфического и неспецифического иммунитета и на разные этапы иммунного ответа, что приводит

к широкому спектру изменений со стороны растворимых дифференцировочных антигенов лейкоцитов. Снижение кумулятивной дозы глюкокортикоидов за счет сокращения продолжительности терапии при использовании НВЛ позволяет уменьшить негативные последствия стероидной терапии, включая ингибирующее воздействие на растворимые формы мембранных молекул иммунокомпетентных клеток.

Таким образом, подключение неинвазивной вентиляции легких к лечению тяжелых обострений хронической обструктивной болезни легких наряду с улучшением общего состояния больных и снижением интенсивности одышки приводит к достоверному увеличению параметров функции внешнего дыхания и сатурации кислорода. Применение дыхательной поддержки в комплексе со стандартной терапией сопровождается сдвигами со стороны растворимых дифференцировочных молекул, характеризующими уменьшение воспалительной активации иммунных клеток. Использование неинвазивной вентиляции легких позволило уменьшить продолжительность стационарного лечения и суммарную курсовую дозу кортикостероидов, которые оказывали неселективное ингибирующее действие на содержание растворимых форм мембранных молекул клеток иммунной системы, более выраженное в контрольной группе. Таким образом, методика двухуровневой неинвазивной вентиляции легких с поддержкой давлением может быть рекомендована для более широкого использования в пульмонологической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внимание исследователей современности привлекает проблема развития хронического воспаления в дыхательных путях, которое характерно для ХОБЛ, и возможности борьбы с ним. ХОБЛ остается наиболее распространенной среди хронических болезней органов дыхания в мире, и распространенность ее продолжает увеличиваться. ХОБЛ является одной из основных причин потери трудоспособности, а среди причин смертности в мире занимает 3-е место и проявляет тенденцию к росту [248, 282, 295]. Медико-социальный и экономический ущерб от ХОБЛ очень велик [282].

Установлено, что неблагоприятное прогрессирующее течение ХОБЛ в значительной мере определяется нарушением иммунологической реактивности организма. Иммунокомпетентные клетки, участвующие в развитии иммунного ответа и воспалительного процесса при ХОБЛ, несут на своей поверхности большое разнообразие мембранных антигенов, которые характеризуют направление и степень их дифференцировки и активации [83, 108]. Растворимые гомологи этих антигенов обнаруживаются в сыворотке крови и других биологических жидкостях и могут быть оценены при раскрытии тонких механизмов развития иммунного воспаления при ХОБЛ. Это направление современных исследований поможет не только охарактеризовать особенности воспаления и иммунного ответа при разных вариантах течения ХОБЛ, но и будет способствовать своевременному и эффективному лечению заболевания.

Наличие различных патогенетических факторов усугубляет тяжесть течения и осложняет возможности терапии ХОБЛ. Респираторные бактериальные инфекции не только являются основной причиной обострений ХОБЛ, ведущих к прогрессированию заболевания и ассоциированных со значительной летальностью [144, 253], но и колонизируют слизистые дыхательных путей в стабильной фазе заболевания, поддерживая хроническое воспаление.

Вместе с тем, факторы, способствующие нарушению колонизационной резистентности дыхательных путей при ХОБЛ, исследованы недостаточно.

Углубленное изучение биологических свойств микрофлоры дыхательных путей в её взаимоотношениях с факторами иммунного ответа макроорганизма необходимо не только для понимания механизмов персистенции воспаления при ХОБЛ, но и для оптимизации терапии. Несмотря на то, что особенности иммунного статуса и респираторного микробиоценоза при патологии органов дыхания являются предметом интенсивного изучения, мало работ по исследованию растворимых форм дифференцировочных лейкоцитарных антигенов и персистентных свойств микроорганизмов у больных с разными вариантами течения ХОБЛ.

Целью настоящего исследования было изучение особенностей течения хронической обструктивной болезни легких в зависимости от состояния иммунного ответа и микробиоценоза респираторного тракта и оценка клинико-функциональных и иммуномодулирующих эффектов терапии.

Для реализации данной цели был использован комплекс клинических, лабораторных и инструментальных исследований. Он включал изучение симптомов (САТ-тест, mMRC) и анамнеза заболевания, подсчет индекса курящего человека, частоты обострений, оксиметрию, общие анализы крови и мочи, определение основных биохимических констант, спирометрию, рентгенографию органов грудной клетки, фибробронхоскопию, электрокардиографию, эхо-доплер-кардиографию и т.д. Также проводилось определение сывороточного содержания растворимых дифференцировочных антигенов клеток иммунной системы (sCD38, sCD25, sCD50, sCD54, sCD14, sCD8, sCD16, sCD95, sHLA I и II класса) с помощью двухсайтового иммуноферментного анализа с применением МКА серии ИКО. Оценка уровня растворимых дифференцировочных антигенов проводилась при сравнении с контрольной группой, состоявшей из 40 здоровых некурящих доноров, сопоставимых по возрасту и полу с больными ХОБЛ. При стабильной ХОБЛ осуществлялось микроскопическое и микробиологическое исследование отделяемого верхних и нижних дыхательных путей с выделением и идентификацией возбудителей, оценкой антибиотикорезистентности, персистентных и патогенных характеристик бактерий. Статистическая обработка

данных проводилась с использованием параметрических и непараметрических критериев, регрессионно-корреляционного анализа, кластерного анализа.

В исследование были включены пациенты старше 40 лет, бывшие или настоящие курильщики, с диагнозом ХОБЛ, установленным в соответствии с критериями GOLD [248] и Федеральными клиническими рекомендациями [131], при наличии информированного согласия. Критериями невключения являлись состояния и заболевания, которые могли повлиять на результаты исследования (бронхиальная астма, за исключением синдрома астма-ХОБЛ, аллергические, аутоиммунные, злокачественные и др. заболевания; инфекции органов дыхания или других локализаций в течение предыдущих 4-х месяцев; прием системных кортикостероидов и/или антибиотиков в течение предыдущих 4-х недель и т.д.).

Когорта пациентов состояла из 257 пациентов: 143 больных ХОБЛ в стабильной фазе (в возрасте 40 – 82 лет, из них 69,9% мужчин) и 114 больных в фазе обострения (в возрасте 44 – 78 лет, из них 61,4% мужчин). Длительность заболевания составила $17,7 \pm 10,2$ лет, индекс курения $36,6 \pm 9,1$ пачка-лет. Большинство больных со стабильной фазой ХОБЛ (61,5%) имели степень тяжести GOLD II или GOLD III; средний ОФВ₁ составил $48 \pm 27\%$ от должной величины ($1,57 \pm 0,98$ л). Частые обострения (≥ 2 за предыдущий год) были зарегистрированы у 44,1% больных стабильной ХОБЛ. Фенотип перекрест-синдрома астма-ХОБЛ был диагностирован у 25 пациентов (неконтролируемое течение БА наблюдалось у 56% пациентов, частично-контролируемое – у 44%). Бронхитический фенотип наблюдался у 24 человек, эмфизематозный – у 14 пациентов, у остальных (80 пациентов) диагностирован эмфизематозно-бронхитический фенотип. Для дальнейшего анализа пациенты с бронхитическим, эмфизематозным и эмфизематозно-бронхитическим фенотипом были объединены в группу «изолированной» ХОБЛ.

У больных стабильной ХОБЛ были изучены биомаркеры состояния иммунитета с определением сывороточного содержания растворимых форм дифференцировочных лейкоцитарных антигенов и молекул гистосовместимости. Также проводилось микробиологическое исследование образцов мокроты/БАЛ и

отделяемого ВДП (мазки со слизистых зева и носа), включавшее не только выделение и идентификацию возбудителей, но и определение персистентных и патогенных характеристик выделенных бактерий. В течение 6 месяцев осуществлялось наблюдение за больными и мониторинг обострений, при развитии обострения проводилось повторное исследование сывороточных маркеров иммунных клеток (29 пациентов).

Сорок два пациента стабильной ХОБЛ со степенью тяжести GOLD III-IV и частыми обострениями в анамнезе были включены в открытое сравнительное исследование влияния дополнительной терапии рофлумиластом на симптомы, частоту обострений, ФВД и содержание растворимых дифференцировочных молекул лейкоцитов. Все больные получали трехкомпонентную терапию, включавшую β_2 -агонист/иГК (салметерол/флютиказона пропионат или формотерола фумарата дигидрат/будесонид) и М-холинолитик (тиотропия бромид). Пациенты были разделены на 2 группы, сопоставимые по возрасту, гендерному составу, индексу курения и исходным функциональным характеристикам. Первую (основную) группу составили 25 пациентов, которым дополнительно был назначен рофлумиласт 500 мкг один раз в день на протяжении 12-ти месяцев. Пациенты второй группы (17 пациентов) получали «тройную терапию» без рофлумиласта.

При обострении ХОБЛ было изучено влияние различных видов терапии на клиничко-функциональные тесты и содержание растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов в сыворотке крови. Были включены пациенты, госпитализированные по поводу обострения в пульмонологическое отделение ГБУЗ НО «Городская клиническая больница №10». В 28,9% случаев они имели степень тяжести GOLD II, в 51,8% - GOLD III, в 19,3% - GOLD IV. Частота среднетяжелых или тяжелых обострений составила $2,08 \pm 1,54$ за предшествующие 12 месяцев. Больные с обострением ХОБЛ получали комплексное лечение согласно стандартам оказания стационарной медицинской помощи взрослому населению Нижегородской области (бронхолитики, кортикостероиды, антибиотики,

муколитики, по показаниям – длительная кислородотерапия, неинвазивная вентиляция легких и т.д.).

Шестьдесят больных с обострением ХОБЛ были включены в открытое сравнительное рандомизированное исследование влияния небулизированного будесонида и преднизолона на ФВД и сывороточный уровень растворимых дифференцировочных молекул лейкоцитов. Включенные пациенты (21 женщина и 39 мужчин) имели степень тяжести бронхообструктивных нарушений GOLD II-III. Они были рандомизированы на 2 группы методом конвертов. Пациенты 1-й группы (24 человека) получали ингаляционные кортикостероиды (будесонид по 2 мг 2 раза в день через небулайзер), пациенты 2-й группы (36 человек) – системные ГК (преднизолон 120 – 180 мг в день внутривенно капельно) в течение 7 – 10 дней. Группы были сопоставимы по возрастно-половому составу, статусу курения и исходным спирометрическим характеристикам.

При тяжелом обострении ХОБЛ, осложненном острой дыхательной недостаточностью, в открытом сравнительном исследовании изучалось влияние неинвазивной механической вентиляции легких на клинико-функциональные параметры и сывороточное содержание растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов. В основную группу вошли 30 пациентов ХОБЛ (13 женщин и 17 мужчин), имевшие степень тяжести GOLD III-IV, выраженную одышку с ЧДД \geq 24 в минуту, клинические признаки утомления дыхательной мускулатуры и усиления работы органов дыхания, при отсутствии противопоказаний к НВЛ [210]. Наряду со стандартной медикаментозной терапией в основной группе применялась НВЛ в режиме двухуровневой вентиляции с поддержкой давлением [6] с использованием аппарата VENTImotion 2, WEINMANN medical technology, Германия, в режиме *Spontaneous/Timed*. Группа сравнения, включившая 24 пациента (10 женщин и 14 мужчин), сопоставимых по полу, возрасту и тяжести состояния, которые получали стандартную терапию без респираторной поддержки.

Были изучены клинико-функциональные показатели и особенности иммунного ответа пациентов в зависимости от степени тяжести, частоты

обострений и фенотипа ХОБЛ. Нарастание тяжести функциональных нарушений было связано с увеличением интенсивности курения и сопровождалось увеличением числа обострений, усилением одышки, кашля, продукции мокроты. При прогрессировании бронхообструктивных нарушений наблюдалось снижение содержания маркеров состояния иммунитета (таблица 7): если при I-II степени тяжести среднее содержание 8-9 из 13 исследованных иммунных маркеров находилось в пределах нормальных значений, то при IV степени отмечалось уменьшение 11 показателей на 30-73% от уровня доноров.

Для больных ХОБЛ с частыми обострениями был характерен более длительный анамнез заболевания, большая интенсивность курения, усиление респираторных симптомов, выраженные функциональные нарушения. Среднее содержание димеров sCD95, sCD54, sCD38, антигенов sCD50 и sCD16, молекул HLA I класса у больных ХОБЛ было ниже донорских значений независимо от частоты обострений. Иммунологический профиль пациентов с частыми обострениями характеризовался снижением еще и других биомаркеров: уровень дифференцировочных антигенов цитотоксических лимфоцитов sCD8, молекул sCD25, sCD54 и sHLA-DR был на 26-40% ниже контрольного уровня, содержание антигенов sCD95 и sCD38 достоверно различалось как по сравнению с донорами, так и с больными, у которых обострения были редкими (таблица 13).

Больные ХОБЛ с сопутствующей БА отличались от «изолированной» ХОБЛ не только более выраженной одышкой и баллом САТ-теста, но и профилем иммунных биомаркеров. Однако влияние перекрест-синдрома астма-ХОБЛ на уровень растворимых дифференцировочных молекул наблюдалось только на ранних стадиях заболевания. У больных с фенотипом БА-ХОБЛ при $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного в отличие от пациентов «изолированной» ХОБЛ аналогичной тяжести отмечен высокий уровень растворимого рецептора интерлейкина-2 (sCD25), который является одним из ключевых медиаторов воспаления и инициации иммунного ответа, в том числе гуморального, а также высокое содержание антигенов sCD95 (Fas/Apo-1) и sHLA I класса (таблица 11), что также отражает

активацию иммунитета. При тяжелых степенях бронхообструктивных нарушений достоверных различий между «изолированной» ХОБЛ и сочетанием с БА не было.

Также кластерный анализ, проведенный при стабильной ХОБЛ с использованием в качестве категориальных группирующих переменных частоты обострений, тяжести и фенотипа заболевания, показал, что фенотип БА-ХОБЛ не относится к независимым факторам, влияющим на содержание биомаркеров. Независимыми характеристиками при распределении больных являлись частота обострений и тяжесть бронхиальной обструкции. В результате проведенного анализа было выделено три кластера пациентов, различающихся по клинико-функциональным характеристикам и уровню растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток. Кластер 1 (50 пациентов) характеризовался большей длительностью заболевания и интенсивностью курения по сравнению с сопоставимым с ним по возрастно-половому составу кластером 2 (30 больных). Также в кластере 1 отмечены более выраженные симптомы (mMRC, CAT), низкие значения $ОФВ_1$ (в среднем $33 \pm 10\%$ должного), большая частота обострений (в среднем $3,1 \pm 1,5$) и бактериальная обсемененность мокроты ($1g\ 8 [7; 8]$ КОЕ/мл) в отличие от кластера 2 ($ОФВ_1\ 80 \pm 27\%$ должного; частота обострений $0,9 \pm 0,8$; бактериальная обсемененность $1g\ 6 [6; 7]$ КОЕ/мл). Различия клинико-функциональных характеристик сопровождались изменениями профиля иммунных маркеров. Кластер 1 характеризовался пониженным содержанием растворимых форм 12 из 13 исследованных антигенов (рецептора апоптоза, молекул адгезии, гистосовместимости, дифференцировочных и активационных маркеров лимфоцитов) по сравнению как с донорами, так и с кластером 2, в котором более половины молекулярных маркеров не отличалось от контрольного уровня. Кластер 3 (12 пациентов) отличался более старшим возрастом по сравнению с остальными и, соответственно, большей частотой ассоциированной сердечно-сосудистой патологии; для этих больных были характерны низкие значения $ОФВ_1$ ($35 \pm 11\%$ должного) и персистирующие респираторные симптомы. При лабораторном исследовании в кластере 3 чаще выявлялись признаки локального и системного воспаления. Среднее количество лейкоцитов мокроты у

них было повышено по сравнению с 1-м кластером. В 3-м кластере повышение уровня СРБ регистрировалась у 25% больных (в 4 раза чаще, чем в других кластерах), анемия хронических болезней – у 41,7% пациентов (в 3 раза чаще по сравнению с другими кластерами), хотя достоверных различий средних значений не было. Иммунологический профиль больных 3-го кластера характеризовался увеличением содержания 11 из 13 исследованных биомаркеров (суммарных и димерных фракций sCD95 и sCD38, суммарных фракций sICAM-1, молекул sICAM-3, антигенов sCD8, sCD25, sCD16, sCD14, молекул гистосовместимости II класса) по сравнению как с контрольной группой, так и с другими кластерами.

При последующем наблюдении в течение 6 месяцев среднетяжелые и тяжелые обострения были зарегистрированы у 29 больных: 41,7% пациентов 3-го кластера, 38% пациентов 1-го кластера и 16,7% пациентов 2-го кластера. Во 2-м кластере было зарегистрировано в 2,3 – 2,5 раза меньше обострений по сравнению с 1-м и 3-м кластерами; при этом период до следующего обострения в 3-м кластере был достоверно короче, чем в остальных.

Таким образом, нарастание тяжести бронхиальной обструкции и частоты обострений при стабильной ХОБЛ в большинстве случаев было ассоциировано с низким уровнем растворимых форм молекул адгезии, гистосовместимости, дифференцировочных и активационных маркеров лимфоцитов, рецептора апоптоза, что указывает на истощение механизмов иммунной защиты при прогрессировании ХОБЛ. Вместе с тем, увеличение содержания маркеров иммунных клеток, наблюдавшееся у части больных, может служить предиктором обострения ХОБЛ, отражая недостаточную эффективность противовоспалительной терапии и необходимость коррекции лечения. При этом изменения растворимых лейкоцитарных дифференцировочных антигенов предшествовали ухудшению клинической симптоматики и оказались более чувствительными, чем рутинные лабораторные тесты. Особо важное значение исследование данных маркеров имеет для пациентов с риском частых обострений и персистирующими симптомами (группа D при комплексной оценке ХОБЛ), которые могут маскировать клиническое ухудшение.

При динамическом наблюдении было установлено влияние фазы заболевания на содержание лейкоцитарных антигенов: при обострении ХОБЛ отмечено нарастание уровней растворимых апоптотических рецепторов, молекул адгезии, молекул гистосовместимости II класса, активационных маркеров sCD38 и sCD25 по отношению к стабильной фазе, что отражает усиление воспалительных сдвигов. Высокие концентрации суммарных антигенов sCD54 и молекул sCD14 в период обострения (превышающие контрольные значения) могут являться маркерами инфекционного характера обострения. Существенное увеличение sCD8 в период обострения, по сравнению как со стабильным течением, так и с группой доноров, прежде всего у больных III-IV степени тяжести, отражает ключевую патогенетическую роль субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Изменения иммунной реактивности организма, выявленные при изучении растворимых форм лейкоцитарных дифференцировочных антигенов, являются важным фактором, способствующим колонизации дыхательных путей условно-патогенной микрофлорой. При микробиологическом исследовании отделяемого бронхов (мокроты/бронхоальвеолярной жидкости) у 84,7% пациентов в стабильной фазе ХОБЛ выделяются бактериальные или грибковые возбудители, при этом у 28,8% больных обнаруживаются микробные ассоциации. При исследовании микробиоценоза НДП больных ХОБЛ было установлено, что наиболее характерными микроорганизмами мокроты, кроме представителей нормальной микрофлоры ротоглотки (стрептококков, нейссерий, стоматokokков), были условно-патогенные микроорганизмы – стафилококки, энтеробактерии и НГОБ, которые встречались соответственно у 22%, 24,6% и 17,8% больных. Выявленное сходство видового состава микробного пейзажа зева и отделяемого бронхов у больных ХОБЛ указывало на большое значение аспирационного пути проникновения бактерий в нижние отделы респираторного тракта. Выявляемость грамотрицательной микрофлоры нарастала по мере продвижения от верхних дыхательных путей к нижним. Увеличение доли энтеробактерий и НГОБ в отделяемом бронхов у больных ХОБЛ было ассоциировано с низкими значениями ОФВ₁ (<50% от должной величины). Также при степени тяжести GOLD III-IV в 2

раза чаще встречались микробные ассоциации, включавшие 3-х и более микроорганизмов, по сравнению с больными со степенью тяжести GOLD I-II (соответственно, в 40% и 19% случаев; $p=0,012$). У 36,4% больных из мокроты высеивались грибы рода *Candida*, преимущественно в ассоциациях с 1 – 5 видами бактерий. Выделение грибковой флоры было ассоциировано с пожилым возрастом и наличием факторов, угнетающих иммунную систему, таких как сахарный диабет.

При исследовании чувствительности к антибактериальным препаратам бактерий, выделенных из мокроты больных ХОБЛ, обнаруживалось большое количество полирезистентных штаммов, устойчивых к 2-м и более антибиотикам: 50% β -гемолитических стрептококков, 75% пневмококков, 100% гемофильных палочек, 81,3% КОС, 31% *S.aureus*, 42,1% дифтероидов, 93,9% НГОБ, 64% энтеробактерий. При степени тяжести GOLD III-IV полирезистентные микроорганизмы выявлялись в 29,9% случаев, что было в 2 раза чаще, чем у больных с $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного (14,5% случаев).

Впервые было проведено исследование комплекса персистентных свойств условно-патогенных бактерий, населяющих дыхательные пути больных ХОБЛ. Полученные изоляты бактерий в различной степени проявляли адгезивные способности, протеолитическую, антилизосимную, антилактоферриновую, антииммуноглобулиновую активности. Наиболее высокой способностью к образованию биопленок обладали НГОБ и КОС, среди которых половина штаммов демонстрировали высокие показатели адгезии к поверхности полистеролового планшета со значениями оптической плотности более 1 ед. Высокая протеолитическая и лизосимная активности, отражающие инвазивные свойства бактериальных патогенов, была характерна для синегнойной палочки и стафилококков, населяющих НДП. Все исследованные штаммы *S.aureus* продуцировали лизосим, 45,5% КОС – обладали протеолитической активностью в качественном тесте, все исследованные культуры *P.aeruginosa* проявляли оба вида активности. Количественный метод оценки протеолитической активности проявил более высокую чувствительность, чем качественная реакция. Среди 29 исследованных штаммов 47,1% *Staphylococcus spp.*, 9,1% энтеробактерий и 1

культура синегнойной палочки гидролизировали субстраты в кислой и щелочной среде, что указывало на наличие у них ферментов с разной специфичностью, усиливающих их инвазивность и патогенность. Корреляций адгезивных свойств, лизоцимной и протеолитической активности бактерий с клиническими особенностями ХОБЛ не было установлено.

С целью изучения бактериальных факторов защиты от специфических и неспецифических механизмов иммунной системы хозяина были определены антилизоцимная, антилактоферриновая и антииммуноглобулиновые активности. Высокий уровень антилизоцимной активности, который проявили 60,5% стафилококков и 64,5% энтеробактерий, был ассоциирован со степенью тяжести GOLD III-IV. Корреляционный анализ позволил установить наличие взаимосвязи между антилизоцимной активностью стафилококков и степенью тяжести ХОБЛ, что указывало на усиление персистентных свойств этих бактерий при нарастании бронхообструктивных нарушений. Антилактоферриновую активность проявляли 90,7% всех исследованных культур, самые высокие значения наблюдались у стафилококков. Для микроорганизмов, выделенных от больных с тяжестью GOLD I-II, были характерны более высокие значения активности по сравнению с GOLD III-IV ($48,16 \pm 40,11$ и $21,53 \pm 30,71$ нг/мл, соответственно, $p=0,01$) и отмечалась положительная корреляция между МОС75 пациентов и АЛФА бактерий ($r=0,5$; $p=0,02$), что может свидетельствовать о важности антилактоферриновой активности для персистентного потенциала бактерий, колонизирующих дыхательные пути при ранних стадиях ХОБЛ. Антииммуноглобулиновую активность против IgM, IgG и IgA, определенную иммуноферментным методом, исследованные бактерии проявляли в 84,4%, 95,7% и 95,9% случаев, соответственно. При этом штаммы бактерий, выделенных из мокроты больных с $ОФВ_1 < 50\%$ должного, инактивировали все 3 класса иммуноглобулинов в 87% случаев, а при $ОФВ_1 \geq 50\%$ должного – в 52,9% случаев ($p=0,017$). Также были обнаружены отрицательные корреляционные связи между функциональными показателями больных и АИГА микроорганизмов. Корреляционный анализ показал, что МОС75 пациентов была связана отрицательной корреляцией с анти-

IgG АИгА ($r=-0,51$; $p=0,04$), а ЖЕЛ больных с анти-IgM активностью микробной флоры ($r=-0,59$; $p=0,019$). Также были выявлены связи между способностью энтеробактерий и стафилококков инактивировать IgA, один из основных факторов местного иммунитета, и степенью тяжести бронхообструктивных нарушений больных, от которых они были получены. Важность этой характеристики для формирования колонизационного потенциала подтверждалось также наличием положительной корреляционной связи между анти IgA активностью бактерий и выраженностью микробной нагрузки ($r=0,48$; $p=0,02$), которая была обнаружена при GOLD I-II. Отсутствие подобной корреляции при продвинутых стадиях ХОБЛ, видимо, объясняется конкурирующим влиянием других факторов на развитие бактериальной колонизации, включая наличие сопутствующей патологии, усиление иммунных нарушений, в том числе, обусловленных терапией, и др.

Бактерии, полученные из отделяемого бронхов, отличались от микрофлоры ВДП активацией механизмов, обеспечивающих устойчивость к местным факторам защиты хозяина, т.е. высоким уровнем антилизоцимной (все возбудители) и анти IgA активности (стафилококки). Также при изучении бактерий, населяющих НДП, были обнаружены положительные корреляции между различными биологическими характеристиками, что указывает на наличие у них целого комплекса взаимосвязанных персистентных и инвазивных свойств. Были установлены связи между анти IgM и анти IgG активностями ($r=0,38$; $p=0,027$), лизоцимной и анти IgG активностями ($r=0,64$; $p=0,0003$), антилизоцимной и анти IgA активностями ($r=0,42$; $p=0,035$). У бактерий, выделенных со слизистых ВДП, отмечена отрицательная корреляция между лизоцимной и антилизоцимной активностями ($r= -0,74$; $p=0,009$), что может быть связано с влиянием лизоцима, продуцируемого как хозяином, так и самим бактериальным агентом, на формирование антилизоцимной активности.

Таким образом, по своим персистентным и инвазивным характеристикам условно-патогенные бактерии, выделенные из очага воспалительного процесса при ХОБЛ, отличались высокой агрессивностью, особенно при тяжелых степенях бронхообструктивных нарушений.

Корреляционный анализ позволил установить существование многочисленных взаимосвязей между клинико-функциональными, иммунологическими характеристиками больных стабильной ХОБЛ и свойствами микрофлоры, колонизирующей дыхательные пути. Как и следовало ожидать, индекс курения был связан отрицательными корреляциями с функциональными легочными параметрами (таблица 34) и позитивными корреляциями – с числом обострений, баллом оценочного теста ХОБЛ и выраженностью одышки (рисунок 14). Индекс одышки (по mMRC) коррелировал с количеством лейкоцитов мокроты, общей микробной нагрузкой и числом видов микроорганизмов (таблица 34). Выявленные связи указывают на значение повреждающего действия курения, персистирующего локального воспаления и микробной колонизации нижних дыхательных путей в прогрессировании заболевания и усилении респираторных симптомов.

Кроме того, были обнаружены отрицательные корреляционные связи между интенсивностью курения и содержанием молекул адгезии sICAM-3, дифференцировочных и активационных клеточных маркеров (молекул sCD8, sCD25, суммарных фракций sCD38), что свидетельствовало об угнетении клеточного звена иммунного ответа у «злостных» курильщиков. Показатели ФВД (ОФВ₁, МОС25, МОС50, МОС75) были связаны положительными корреляциями с содержанием растворимых форм антигенов sCD54, sCD25, sCD38, sCD8, молекул гистосовместимости I и II класса, суммарных фракций молекул sCD95 (таблица 35), что свидетельствовало об участии иммунных механизмов в прогрессировании бронхообструктивных нарушений.

С другой стороны, индекс курения и параметры ФВД (ЖЕЛ, МОС75) проявляли отрицательные корреляции с бактериальными факторами персистенции, показывая, что нарастание интенсивности курения и вентиляционных нарушений ассоциировано с появлением в НДП микрофлоры, обладающей высокой ингибирующей активностью в отношении двух основных классов иммуноглобулинов – IgM и IgG.

Также были выявлены связи между содержанием маркеров состояния иммунитета пациентов и персистентными характеристиками выделенной у них микрофлоры. Положительные корреляции между персистентными свойствами бактерий и сывороточным содержанием растворимых рецепторов интерлейкина-2 и молекул адгезии ICAM-1 косвенно свидетельствовали, что формирование способности бактерий ингибировать лизоцим, иммуноглобулины А и G происходит в процессе взаимодействия с активированными факторами иммунного ответа пациента. Отрицательные корреляции показали, что у больных ХОБЛ при снижении уровня маркеров активации T-клеточного звена (sCD38, sCD8 и sHLA-I) из дыхательных путей высевалась микрофлора с выраженными инвазивными и персистентными характеристиками (ЛА, АЛА, АЛФА, АИГА). Как было установлено ранее, для этих больных также характерны значительные нарушения легочной функции и тяжелое течение с частыми обострениями.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты позволили расширить представления о механизмах развития и прогрессирования ХОБЛ и предложить концепцию патогенеза ХОБЛ с позиций нарушения гомеостаза в экосистеме «микрофлора-макроорганизм» (рисунки 16, 17).

Использование современных методов позволило оценить патогенетические эффекты терапии при профилактике и лечении обострений ХОБЛ. У больных стабильной ХОБЛ III-IV степени тяжести при добавлении рофлумиласта к «тройной терапии» отмечено снижение количества обострений в течение года (в том числе умеренных и тяжелых), средней длительности обострения и тенденция к уменьшению числа госпитализаций по любым причинам в отличие от группы сравнения. При анализе данных всех пациентов значительно снизился балл САТ-теста с $26,2 \pm 4,3$ до $22,8 \pm 7,9$ баллов ($p=0,02$), при этом межгрупповых различий по этому параметру не было. Хотя функциональные показатели существенно не улучшились (в обеих группах отмечалось некоторое снижение ФЖЕЛ в течение года), однако прогрессирование бронхообструктивных нарушений замедлилось при добавлении рофлумиласта: показатели $ОФВ_1$ и $СОС_{25-75}$ снизились по сравнению с исходным уровнем только в группе сравнения. Изменений $ОФВ_1$ в

течение года в группе рофлумапта практически не было (18 [-216; 62] мл/год), в то время как в группе сравнения зарегистрировано снижение этого показателя (-178 [-256; -128] мл/год; различия между группами достоверны при $p=0,048$). Различий по частоте серьезных нежелательных явлений между группами не было, хотя при приеме рофлумапта отмечена тенденция к более частым гастроинтестинальным расстройствам, которые наблюдались в начале приема препарата и купировались самостоятельно. До начала терапии уровень большинства исследованных антигенов был повышен, различий между группами не было. Под воздействием длительной комбинированной терапии иГК+ДДБА+ДДАХ зарегистрировано снижение исходно повышенного содержания молекул sCD8, sCD25, sHLA-DR. Добавление ингибитора ФДЭ-4 позволило усилить противовоспалительные эффекты «тройной терапии» и дополнительно снизить уровень суммарных и олигомерных фракций sCD38, суммарного антигена sCD54, молекул sCD50 и sHLA-I. Снижение содержания растворимых дифференцировочных антигенов происходило постепенно к концу 3-го месяца терапии, после этого стабилизируясь на нормальном или даже низком уровне. Таким образом, добавление рофлумапта усиливает противовоспалительные эффекты комбинированной терапии и способствует профилактике обострений ХОБЛ.

При обострении ХОБЛ было проведено открытое сравнительное рандомизированное исследование эффективности, безопасности и влияния на концентрацию растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток небулизированного будесонида и преднизолона. В обеих группах уменьшилась одышка, кашель и продукция мокроты, снизился балл САТ-теста, количество хрипов в легких и СОЭ. В обеих группах отмечен прирост SpO_2 и $ОФВ_1$, в группе преднизолона – также ФЖЕЛ и индекса Тиффно. В группе преднизолона в отличие от будесонида наблюдался прирост уровня нейтрофильных лейкоцитов крови, коррелировавший с дозой и длительностью терапии сГК, а также увеличение среднего содержания глюкозы крови по сравнению с исходным. Гипергликемия при лечении преднизолоном встречалась в 4,6 раз чаще по сравнению с

небулизированным будесонидом (19,4% и 4,2% соответственно). В обеих группах снизились исходно повышенные концентрации антигенов sCD38 суммарного и sCD25. Кроме того, преднизолон в отличие от иГК оказывал неселективное угнетающее действие и на другие циркулирующие молекулы лейкоцитов, исходное содержание которых было низким, усугубляя существующий иммунный дисбаланс. Так, под действием сГК еще больше снизились концентрации олигомерных фракций рецепторов апоптоза sCD95 и молекул адгезии sCD54; уменьшение уровня sCD50 коррелировало с дозой и длительностью применения преднизолона. Полученные результаты показали, что небулизированный будесонид представляет собой эффективную альтернативу преднизолону при обострении ХОБЛ и при этом реже ассоциируется с развитием гипергликемии и угнетением иммунных клеток, которое проявляется снижением уровня биомаркеров.

В открытом сравнительном исследовании было изучено влияние неинвазивной механической вентиляции легких на клиничко-функциональные и иммунные показатели больных с тяжелым обострением ХОБЛ, осложненным острой дыхательной недостаточностью, имевших выраженную одышку с клиническими признаками утомления дыхательной мускулатуры. Уменьшение одышки и увеличение ОФВ₁ было отмечено в обеих группах, однако в группе больных, получавших респираторную поддержку, средний прирост ОФВ₁ был в 3 раза выше, чем в группе стандартной терапии без НВЛ (416 [157; 770] мл и 141 [96; 175] мл, соответственно, $p < 0,001$). На фоне дыхательной поддержки также повысились ФЖЕЛ и ПОС. Увеличение сатурации кислорода в процессе лечения выявлено у пациентов обеих групп, однако на фоне НВЛ подъем SpO₂ происходил быстрее. Применение дыхательной поддержки в комплексе со стандартной терапией сопровождалось изменениями со стороны растворимых дифференцировочных молекул, характеризующими ослабление воспалительной активации: снижение содержания антигенов sCD95 суммарного, sCD50, sCD16. Использование НВЛ позволило уменьшить продолжительность стационарного лечения (13,3±1,9 дней в группе НВЛ и 14,4±2,1 дней в контрольной группе,

$p=0,043$) и курсовую дозу сГК, которые оказывали неселективное ингибирующее действие на растворимые формы мембранных молекул иммунных клеток, более выраженное в контрольной группе. В контрольной группе наблюдалось снижение содержания 6 из 13 исследованных антигенов: суммарного и олигомерного sCD95, суммарного sCD38, sCD25, sCD50, sHLA-DR.

ВЫВОДЫ

1. Клинические варианты ХОБЛ характеризуются особенностями сывороточного пула иммунных маркеров. Отличительной чертой фенотипа с частыми обострениями являлось уменьшение концентраций растворимых форм маркера цитотоксических лимфоцитов CD8, рецептора интерлейкина-2, молекул ICAM-1, молекул гистосовместимости II класса на 26-40% ниже нормы, а также снижение содержания растворимого Fas рецептора, модулирующего апоптоз, и молекул sCD38, регулирующих активацию клеток и развитие бронхоконстрикции, по сравнению как с контролем, так и с редкими обострениями. Указанные иммунные нарушения ассоциировались с длительным анамнезом, высокой интенсивностью курения, усилением клинической симптоматики и бронхообструктивных нарушений, увеличением частоты обострений.

2. Наличие перекрест-синдрома (бронхиальная астма – ХОБЛ) отягощало выраженность респираторных симптомов при тенденции к меньшей интенсивности курения. К особенностям сывороточного пула иммунных маркеров при фенотипе перекрестного синдрома на ранних стадиях можно отнести увеличение концентраций модулятора апоптоза sCD95 и растворимых форм ключевых маркеров инициации иммунного ответа CD25 и HLA-I на 10-20% выше нормальных значений, а также повышение содержания адгезивных молекул sICAM-1 и sICAM-3, дифференцировочных и активационных маркеров sCD8 и sCD38 по сравнению с «изолированной» ХОБЛ.

3. Обнаруженные положительные корреляции между уровнем $ОФВ_1$ и содержанием растворимых форм маркеров цитотоксических лимфоцитов CD8, активационных молекул CD25 и CD38 свидетельствуют об участии иммунных механизмов в прогрессировании бронхообструктивных нарушений при ХОБЛ.

4. При стабильной ХОБЛ повышение сывороточного уровня растворимых форм мембранных молекул иммунных клеток является предиктором обострения и обладает большей информативностью по сравнению с рутинными лабораторными тестами. Для обострения заболевания характерно дальнейшее

усиление воспалительных сдвигов с нарастанием концентраций растворимых форм антигенов CD54, CD50, CD95, CD8, CD38, CD25 и HLA-DR в 1,5 – 3 раза по сравнению со стабильной фазой.

5. Бактериальные и грибковые возбудители в мокроте и бронхоальвеолярной жидкости обнаруживались у 84,7% пациентов стабильной ХОБЛ, свидетельствуя о колонизации слизистых бронхиального дерева. В составе микробиоценоза нижних дыхательных путей при ХОБЛ доминировали условно-патогенные микроорганизмы (стафилококки, энтеробактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии) и грибы рода *Candida* в сочетании с представителями индигенной микрофлоры ротоглотки (стрептококками, нейссериями, стоматokokками). Значительное сходство в видовом составе микробиоценоза отделяемого бронхов и зева у обследованных больных указывает на значение аспирационного пути распространения инфекции.

6. При прогрессировании ХОБЛ возрастает обсемененность нижних дыхательных путей энтеробактериями (в 2 раза) и неферментирующими грамотрицательными бактериями (в 3 раза), вдвое чаще встречаются микробные ассоциации и полирезистентные к антибиотикам штаммы по сравнению с I-II степенями тяжести. На ранних стадиях заболевания в 5 раз чаще выявляются коагулаза-негативные стафилококки. Появление в микробном пейзаже бронхов грибов рода *Candida* ассоциируется с пожилым возрастом и действием иммуносупрессивных факторов (предшествующая кортикостероидная терапия, сахарный диабет).

7. По своим персистентным и инвазивным свойствам условно-патогенные бактерии из нижних дыхательных путей отличались высокой агрессивностью с повышением протеолитической, антилактоферриновой, антилизозимной активности. Для ранних стадий ХОБЛ было более характерно усиление антилактоферриновой активности стафилококков и положительная корреляция между анти-IgA активностью бактерий и степенью микробной нагрузки. При прогрессировании ХОБЛ отмечалось расширение спектра

антииммуноглобулиновой активности, увеличение анти-IgA и антилизосимной активностей стафилококков и энтеробактерий.

8. Обнаруженные многочисленные корреляционные связи между уровнем биомаркеров состояния иммунитета пациентов и антилактоферриновой, антииммуноглобулиновой, антилизосимной и лизоцимной активностями выделенных у них бактерий свидетельствуют о комплексном, взаимно отягощающем характере кооперации этих факторов в патогенезе ХОБЛ.

9. При стабильной ХОБЛ тяжелой и крайне-тяжелой степени добавление рофлумиласта к трехкомпонентной ингаляционной терапии приводит к уменьшению (в 1,6 – 2 раза) количества и длительности обострений, выраженности симптомов, предотвращает снижение ОФВ₁ на фоне нормализации уровня молекул sCD50, sCD38 и sHLA-I вследствие усиления противовоспалительного действия.

10. При сравнительном исследовании небулизированного будесонида и преднизолона при обострении ХОБЛ в обеих группах отмечалась положительная клиническая динамика, прирост ОФВ₁ и сатурации кислорода, а также нормализация концентраций активационных молекул sCD25 и sCD38. Вместе с тем использование системных кортикостероидов сопровождалось более частым развитием гипергликемии и, в ряде случаев, иммуносупрессивными влияниями.

11. При обострении ХОБЛ, осложненном острой дыхательной недостаточностью, включение в комплекс лечебных мероприятий неинвазивной механической вентиляции легких с поддержкой давлением приводит к более быстрому и выраженному улучшению функции внешнего дыхания и сатурации кислорода, уменьшению продолжительности госпитализации и курсовой дозы системных кортикостероидов, что позволяет уменьшить их иммуносупрессивное воздействие. Противовоспалительные эффекты комплексного лечения с респираторной поддержкой подтверждаются снижением содержания иммунных маркеров (sCD50, sCD95 и sCD16).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве неблагоприятных прогностических критериев, указывающих на тяжелое течение ХОБЛ с частыми обострениями, может использоваться выявление низкого уровня суммарных фракций антигенов sCD95 и sCD38, молекул sCD8, sCD25, sCD50, а также высокой антилизоцимной активности и широкого спектра антииммуноглобулиновой активности бактерий, выделенных из мокроты или бронхоальвеолярной жидкости.

2. Мониторинг содержания антигенов sFas, молекул адгезии sICAM-1 и sICAM-3, растворимых молекул гистосовместимости II класса, активационных и дифференцировочных антигенов sCD8, sCD25 и sCD38 у больных ХОБЛ показан для раннего выявления активации воспалительного процесса с целью своевременной коррекции терапии, особенно у пациентов с тяжелой/крайне тяжелой ХОБЛ и персистирующими симптомами.

3. Повышение сывороточного уровня биомаркеров состояния иммунитета может рассматриваться как дополнительное показание к включению ингибитора фосфодиэстеразы-4 (рофлумиласт) в схему лечения больных тяжелой/крайне тяжелой ХОБЛ с целью усиления противовоспалительного действия.

4. Исследование сывороточного уровня циркулирующих антигенов sCD50, sCD54, sCD25, sCD38, sCD95, sCD16 и молекул гистосовместимости в динамике рекомендуется использовать для оценки иммуномодулирующих эффектов терапии.

5. Подтвержденная клиническая эффективность и безопасность небулизированного будесонида и его иммуномодулирующие эффекты позволяют рекомендовать его более широкое применение для лечения обострений ХОБЛ, особенно у больных с сопутствующими метаболическими нарушениями и частыми обострениями, требующими повторных курсов кортикостероидной терапии.

6. Использование двухуровневой неинвазивной вентиляции легких с поддержкой давлением в комплексном лечении обострения хронической

обструктивной болезни легких, осложненного острой дыхательной недостаточностью, способствует улучшению сатурации кислорода и функции внешнего дыхания, позволяет сократить длительность госпитализации и потребность в кортикостероидах, сопровождается динамикой со стороны молекулярных биомаркеров, что обосновывает более широкое применение этого метода в условиях пульмонологического и терапевтического отделения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абатуров, А.Е. Роль местных ингибиторов протеаз в неспецифической защите респираторного тракта [Электронный ресурс] / А.Е. Абатуров // Здоровье ребенка. – 2011. – № 4 (31). – Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/23063>. – Дата обращения: 26.01.2017
2. Абросимов, В.Н. Кашель [Текст] / В.Н. Абросимов, А.Г. Чучалин. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2016. – 160 с.
3. Абросимов, В.Н. Реабилитация больных ХОБЛ [Текст] / В.Н. Абросимов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 112 с.
4. Абросимов, В.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких и пневмосклероз – еще один фенотип [Текст] / В.Н. Абросимов // Пульмонология. – 2012. – №4. – С. 95-99.
5. Авдеев, С.Н. Значение моксифлоксацина для терапии ХОБЛ [Текст] / С.Н. Авдеев // Consilium medicum. – 2013. – Т. 15, № 3. – С. 5-12.
6. Авдеев, С.Н. Подбор режимов неинвазивной вентиляции легких у больных ХОБЛ [Текст] / С.Н. Авдеев, Г.Е. Баймаканова. – М. : ФГУ «НИИ Пульмонологии» ФМБА России, 2011.
7. Авдеев, С.Н. Терапия обострения хронической обструктивной болезни легких [Текст] / С.Н. Авдеев // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т. 11, № 4. – С. 182-188.
8. Алтынова, Е.И. Клинико-лабораторная характеристика больных хронической обструктивной болезнью легких и бронхоэктазами при эндобронхиальных методах лечения [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.04 / Елена Ивановна Алтынова. – Омск, 2013. – 22 с.
9. Андреюк, В.А. Региональные особенности хронической обструктивной болезни легких у пациентов Ставропольского края [Текст]: дис. ...канд. мед. наук : 14.00.05 / Владимир Александрович Андреюк. – Ставрополь, 2008. – 112 с.

10. Антикарнозиновая активность стафилококков как критерий оценки их персистентного потенциала [Текст] / О.Л. Карташова [и др.] // Журнал микробиологии. – 2006. – № 4. – С. 13-16.

11. Бабак, С.Л. Респираторная поддержка в паллиативной медицине: современная клиническая парадигма [Текст] / С.Л. Бабак, М.В. Горбунова, А.Г. Малявин // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2016. – № 3. – С. 13-21.

12. Баранова, Н.И. Характеристика иммунного статуса больных аллергическими заболеваниями дыхательных путей с бактериальной сенсibilизацией [Текст] / Н.И. Баранова, Е.М. Костина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – № 8. – С. 21-23.

13. Баранова, О.Н. Микробиологические пейзажи госпитальных штаммов у детей с иммунодефицитными состояниями. / О.Н. Баранова, Г.Б. Ермолина, Е.А. Нестерова [Текст] // Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 26-27 апреля 2007 г.). – М.: Санэпидмедиа, 2007. – Т.3. – С.93.

14. Билев, А.Е. Нарушения микробной экологии при бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких [Текст] : автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.30 / Александр Евгеньевич Билев. – СПб., 2003. - 34 с.

15. Биологическая характеристика эковаров коагулазонегативных стафилококков, выделенных от новорожденных пациентов детского стационара [Текст] / Е.В. Беляева [и др.] // Медицинский альманах. – 2016. – № 3 (43). – С. 36–39.

16. Бисенова, Н.М. Анализ антибиотикочувствительности штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных из мокроты больных с обострением ХОБЛ [Текст] / Н.М. Бисенова, А.С. Ергалиева // Современная медицина: актуальные вопросы. – 2015. – Т. 39, № 3. – С. 97-102.

17. Богатырева, Е.В. Иммунологические маркеры хронического обструктивного бронхита и атопической бронхиальной астмы [Текст] / Е.В. Богатырева // Вятский медицинский вестник. – 2005. – №1. – С. 47.

18. Бухарин О.В. Медико-экологические аспекты микросимбиоза человека [Текст] / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвятцов, Ю.А. Хлопко // Экология человека. – 2010. – № 8. – С. 28-31.
19. Вальшев, А.В. Факторы персистенции энтеробактерий и влияние на них пробиотиков при дисбиозе кишечника [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Александр Владимирович Вальшев. – Оренбург, 1997. – 18 с.
20. Вальшева, И.В. Антилактоферриновая активность микроорганизмов [Текст] : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / Ирина Викторовна Вальшева. – Оренбург, 2005. – 140 с.
21. Василенко, Л.В. Эпидемиология хронической обструктивной болезни легких и эффективность программы легочной реабилитации в промышленном городе Свердловской области [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.25 / Лариса Валерьевна Василенко. – Самара, 2010. – 28 с.
22. Веселова, М.А. Изучение Quorum sensing систем регуляции у *Pseudomonas chlororaphis* и *Burkholderia ceracia* [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.15 / Марина Анатольевна Веселова. – М., 2008. – 28 с.
23. Визель, А.А. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ). Перемены как повод для обсуждения [Текст] / А.А. Визель, И.Ю. Визель, Н.Б. Амиров // Вестник современной клинической медицины. – 2015. – Т. 8, № 1. – С.62-69.
24. Визель, А.А. Хроническая обструктивная болезнь легких: состояние проблемы 2016 [Текст] / А.А. Визель, И.Ю. Визель // Лечащий врач. – 2016. – № 4. – С. 78.
25. Визель, И.Ю. Ретроспективный анализ эффективности ингаляционных глюкокортикостероидов у больных хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / И.Ю. Визель, А.А. Визель, Н.Б. Амиров // Практическая медицина. – 2016. – Т. 95, № 3. – С. 29-32.
26. Вирусно – бактериально – грибковые ассоциации при хроническом тонзиллите у детей [Текст] / И.А. Гудима [и др.] // Журнал микробиологии. – 2001. – № 5. – С. 16-19.

27. Вишнякова, Л.А. Микробиологические и иммунологические методы диагностики инфекционного процесса при неспецифических заболеваниях легких. Методические рекомендации [Текст] / Л.А. Вишнякова, М.Е. Фаустова. – Л.: Издательство ВНИИ пульмонологии МЗ СССР, 1990.

28. Влияние озонотерапии на сывороточный уровень растворимого CD95 антигена и содержание CD95⁺-клеток при раке молочной железы / А.В. Алясова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 8-14.

29. Влияние терапии будесонидом на уровни цитокинов и молекул межклеточной адгезии у подростков со среднетяжелой бронхиальной астмой [Текст] / Н.А. Геппе [и др.] // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2009. – №2. – С.40-42.

30. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae* [Текст] / О.И. Кречикова [и др.] // Современные методы клинической микробиологии. – Смоленск: МАКМАХ, 2003. – Выпуск 1. – С. 16-33.

31. Вылегжанина, Т.Г. Взаимосвязь аллергического ринита и бронхиальной астмы [Электронный ресурс] / Т.Г. Вылегжанина // Consilium medicum. – 2001. – № 12. – Режим доступа: http://con-med.ru/magazines/consilium_medicum/consilium_medicum-12-2001/vzaimosvyaz_allergicheskogo_rinita_i_bronkhialnoy_astmy/ - Дата обращения: 26.01.2017.

32. Гармаш, В.Я. Влияние оксигенотерапии на утилизацию активных форм кислорода и липоперекисей крови больных хронической обструктивной болезнью легких, осложненной дыхательной недостаточностью [Текст] / В.Я. Гармаш, Н.К. Заигрова // Факультетская клиника: сб. науч. трудов, посвященный юбилею Заслуженного деятеля науки Российской Федерации, профессора Гармаша Владимира Яковлевича. – Рязань, 2016. – С. 45-47.

33. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2011 г.): пер. с англ. [Текст] / под ред. А.С. Белевского. – М.: Российское респираторное общество, 2012. – 80 с.

34. Грузина, В.Д. Коммуникативные сигналы бактерий [Текст] / В.Д. Грузина // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48, № 10. – С. 32-39.
35. Гульнева, М.Ю. Факторы персистенции условно-патогенных микроорганизмов, выделенных у больных ревматическими заболеваниями [Текст] / М.Ю. Гульнева, А.Ю. Кулибин, Э.В. Малафеева // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 9-1 – С. 45-47.
36. Давыдченко, С. В. Значение респираторной инфекции в обострении хронической обструктивной болезни легких [Текст] / С.В. Давыдченко, А.А. Бова // Клиническая медицина. – 2007. – Т. 85, № 5. – С. 10-15.
37. Данилов В.А. Особенности ведения больных с хронической обструктивной болезнью легких в условиях сельской амбулатории [Текст] / В.А. Данилов, В.Я. Гармаш // Объединенный медицинский журнал. – 2007. – №1. – С. 34-36.
38. Данилов, А.В. Опыт применения эреспала (фенспирид) и спиривы (тиотропия бромид) у работников сельскохозяйственного предприятия с ранними стадиями хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) [Текст] / А.В. Данилов, В.Я. Гармаш, Д.Р. Ракита // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2008. – № 3. – С. 66-71.
39. Дворецкий, Л.И. Инфекция и хроническая обструктивная болезнь легких [Текст] / Л.И. Дворецкий // Consilium medicum. – 2001. – Т. 3, № 12. – С. 587-593.
40. Дегтева, Г.К. Микробные гидролазы – ферментные препараты [Текст] / Г.К. Дегтева, С.Н. Лавровский, Е.В. Беляева. – Н.Новгород : ННГУ, 2001. – 224 с.
41. Диагностическое значение персистентных характеристик стафилококков при бактерионосительстве [Текст] / О.Л. Карташова [и др.] // Журнал микробиологии. – 2007. – № 5. – С. 13-16.
42. Евсегнеева, И.В. Клинико-патогенетическая роль растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы в развитии иммунопатологии человека [Текст] : дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.36 / Ирина Валентиновна Евсегнеева. – М., 2005. – 259 с.

43. Ермолина, Г.Б. Особенности микрофлоры дыхательных путей при различных респираторных заболеваниях [Текст] / Г.Б. Ермолина, Е.В. Беляева, Г.К. Дегтева // Нижегородский медицинский журнал. – 2004. – №1. – С. 8.

44. Журавлева, Н.Е. Апоптоз лимфоцитов в механизме развития атопической бронхиальной астмы и влияние на него специфической иммунотерапии [Текст] : автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.36 / Наталья Евгеньевна Журавлева. – М., 2003. – 34 с.

45. Заболеваемость населения старше трудоспособного возраста (с 55 лет у женщин и с 60 лет у мужчин) по России в 2013 году [Электронный ресурс] // Статистические материалы.– М., 2014. – Часть VII.– Режим доступа: <http://www.gks.ru>. – Дата обращения: 26.01.2017.

46. Захарова, Ю.В. Влияние адгезивной активности бактерий на их количественное содержание в кишечнике у вич-инфицированных детей [Текст] / Ю.В. Захарова, А.А. Марковская // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 7. – С. 61-63 .

47. Зенкина, Л.В. Бронхиальная астма: особенности эндогенной регуляции межклеточных взаимодействий в зависимости от клинико-патогенетического варианта [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.05 / Лариса Владиславовна Зенкина. – Красноярск, 2007. - 26 с.

48. Зигангирова, Н.А. Молекулярные подходы к созданию медикаментозных средств для борьбы с хроническими инфекциями [Текст] / Н.А. Зигангирова, А.Л. Гинцбург // Журнал микробиологии. – 2007. – № 4. –С. 103-109.

49. Значение показателей иммунного ответа у больных с ВЭБ-инфекционным мононуклеозом в прогнозировании течения и эффективности противовирусной и иммунокорректирующей терапии [Текст] / Т.А. Свинцова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2013. – №1. – С. 7-14.

50. Значимость факторов патогенности условно-патогенных микроорганизмов при оценке их этиологической роли в развитии заболевания [Текст] / Е.С. Кунилова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 4.– С. 699 – 704.

51. Зыков, К.А. Подходы к лекарственной терапии больных ХОБЛ стабильного течения: предлагаемый алгоритм лечения [Текст] / К.А. Зыков, С.И. Овчаренко // Медицинский совет. – 2015. – № 17. – С. 24-31.

52. Ильницкая, А.С. Анализ факторов персистенции у бактерий, вегетирующих на слизистой верхних и нижних дыхательных путей у больных с острыми и хроническими бронхолегочными заболеваниями [Текст] / А.С.Ильницкая, В.В. Кичикова // Медицинский альманах. – 2011. – № 4. – С.69-71.

53. Иммуноферментный способ определения растворимой формы HLA-DR антигенов в сыворотке крови человека [Электронный ресурс] : пат. 2237249 Рос. Федерация, МПК G01N33/577 / Н.Е. Худякова [и др.]; заявитель и патентообладатель Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной. - № 2002115475/15, заявл. 10.06.2002; опубл. 27.09.2004, Бюл. №1. – Режим доступа: http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1485450033940. – Дата обращения: 26.01.2017.

54. Инфекционное обострение ХОБЛ: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике [Текст] / А.Г. Чучалин [и др.] // Российские медицинские вести. – 2006. – №1. – С. 4-18.

55. Исследование применения неинвазивной вентиляции легких при острой дыхательной недостаточности на фоне обострения хронического обструктивного заболевания легких [Текст] / С.Н. Авдеев [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 1998. – № 3. – С. 45-51.

56. Исследование факторов патогенности бактерий, выделенных от детей в многопрофильном стационаре [Текст] / Г.Б. Ермолина [и др.] // Современные проблемы эпидемиологии: сборник статей, посвященных 65-летию кафедры эпидемиологии Нижегородской государственной медицинской академии. – Н. Новгород : НижГМА, 2007. – С. 62-67.

57. Караулов, А.В. Иммунотерапия респираторных заболеваний: руководство для врачей [Текст] / А.В. Караулов, В.Ф. Ликов. – М., 2004. – 33 с.

58. Карташова, О.Л. Регуляция персистентных свойств микроорганизмов факторами различной природы (обзор) [Электронный ресурс] / О.Л. Карташова, Т.М. Уткина // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2013. – № 1. – Режим доступа: <http://www.elmag.uran.ru>. – Дата обращения: 26.01.2017.

59. Кириллов, Д.А. Лекарственная регуляция персистентных свойств микроорганизмов [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Давид Арчилович Кириллов. – Оренбург, 2004. – 23 с.

60. Кожаева, В.Б. Клинико-микробиологические особенности формирования хронической обструктивной болезни легких у животноводов [Текст] : дис. ... канд. мед. наук: 14.00.43 / Вера Борисовна Кожаева. – Благовещенск, 2005. – 138 с.

61. Комкова, О.П. Антилизозимная активность *Escherichia coli*, выделенной на разных этапах естественной циркуляции вида [Текст] / О.П. Комкова, А.М. Образцова, Н.А. Сидорова // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. Биологические науки. – 2016. – Т. 155, № 2. – С. 110-113.

62. Костюкова, Н.Н. Начальный этап инфекционного процесса – колонизация и пути ее предотвращения [Текст] / Н.Н. Костюкова // Журнал микробиологии. – 2001. – № 9. – С. 103-109.

63. Кубышева, Н.И. Молекулярные и клеточные маркеры воспаления при хронической обструктивной болезни легких [Текст] : дис. ... д-ра биол. наук : 14.03.09 / Наиля Исхаковна Кубышева. – Н. Новгород, 2012. – 356 с.

64. Ланкина, М.В. Микрофлора зева человека как показатель определения резистентности организма [Текст] / М.В. Ланкина // Журнал микробиологии. – 2002. – №3. – С.97-99.

65. Латышева, А.Н. Клинико-патогенетические варианты бронхиальной астмы и хроническая обструктивная болезнь легких: особенности окислительно-восстановительного статуса и эндогенной регуляции межклеточных взаимодействий [Текст] : дис. ... канд. мед. наук: 14.00.05 / Алена Николаевна Латышева. – Красноярск, 2009. - 122 с.

66. Любавина, Н.А. Иммуитет при обструктивных болезнях легких и сахарном диабете 2 типа. Изменение иммунитета, клиническое значение [Текст] / Н.А. Любавина, Г.Н. Варварина, В.В. Новиков. – Н. Новгород, 2012. – 132 с.
67. Максимова, А.В. Растворимые формы мембранных белков клеток иммунной системы при бронхиальной астме у детей [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 14.00.36 / Анна Владимировна Максимова. – Н. Новгород, 2006. – 25 с.
68. Малиновская, Н.А. Роль НАД⁺-зависимых механизмов в регуляции нейрон-глиальных взаимодействий при ишемии головного мозга и нейродегенерации [Текст] : дис. ... д-ра мед. наук : 14.03.03 / Наталия Александровна Малиновская. – Кемерово, 2014. – 321 с.
69. Маркер эндотелиальной дисфункции CD38/АДФ-рибозилциклаза при бронхиальной астме [Текст] / Е.А. Собко [и др.] // Клиническая медицина. – 2013. – Т. 91, №2. – С. 34-38.
70. Механизмы выживания бактерий [Текст] / О.В. Бухарин [и др.]. – М. : Медицина, 2005. – 367 с.
71. Микробиоценоз респираторного тракта больных с хроническими заболеваниями нижних дыхательных путей: аналитический обзор [Текст] / В.А. Никифоров [и др.]. – Н. Новгород : ФГУН ННИИЭМ им академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, 2010. – 31 с.
72. Микробиоценозы и здоровье человека [Текст] / В.А. Алешкин [и др.]. – М.: ООО Издательство «Династия», 2015. – 548 с.
73. Микробный состав флоры верхних дыхательных путей у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких в различные периоды течения заболевания [Электронный ресурс] / Е.А. Гилицанов [и др.] // Практическая медицина. Оториноларингология. – 2015. – Т.2. – Режим доступа: <http://pmarchive.ru/mikrobnyj-sostav-flory-verxnix-dyxatelnyx-putej-u-pacientov-s-xronicheskoj-obstruktivnoj-boleznyu-legkix-v-razlichnye-periody-techeniya-zabolevaniya/>. – Дата обращения – 26.01.2017.

74. Микрофлора, колонизационная резистентность слизистых и мукозальный иммунитет [Текст] / А.В. Караулов [и др.] // Иммунология. – 2015. – Т. 36, №5. – С. 290-295.
75. Миронов, А.Ю. Архитектоника микробной экологии человека в норме и при некоторых патологических состояниях [Текст] : автореф. дис. ...д-ра мед. наук : 03.00.07 / Андрей Юрьевич Миронов. – М., 2002. – 44 с.
76. Митюшова, Е.В. Роль интерлейкина-2 и JAK/STAT сигнализации в экспрессии рецептора интерлейкина-2 в лимфоцитах человека [Текст] : дис. ... канд. биол. наук : 03.03.04 / Елена Викторовна Митюшова. – СПб., 2013. – 101 с.
77. Михайлова, Е.А. Антииммуноглобулиновая активность бактерий и ее диагностическая ценность [Текст] / Е.А. Михайлова, А.П. Луда, М.И. Бигеев // Персистенция бактерий: сборник науч. тр. / под ред. О.В. Бухарина. – Куйбышев, 1990. – С. 107-111.
78. Михалева, О.О. Особенности иммунной защиты организма при хронической обструктивной болезни легких в зависимости от характера бактериальной и микотической сенсibilизации [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.05 / Ольга Олеговна Михалева. – Уфа, 2008. – 23 с.
79. Небулайзерная терапия бронхолитиками и суспензией пульмикорта в лечении тяжелого обострения бронхиальной астмы [Текст] / С.И. Овчаренко [и др.] // Пульмонология. – 2003. – № 6. – С. 75-83.
80. Небулизированный будесонид (суспензия Пульмикорта) при тяжелом обострении ХОБЛ [Текст] / С.Н. Авдеев [и др.] // Пульмонология. – 2003. – № 5. – С. 81-88.
81. Неинвазивная вентиляция легких : учеб.-метод. пособие [Текст] / А.Е. Скрыгин [и др.]. – Минск : БГМУ, 2011. – 27 с.
82. Никифоров В.А. Иммунный статус макроорганизма. Его оценка и способы иммуномодуляции: учебное пособие [Текст] / В.А. Никифоров, Е.И. Ефимов, Ю.Г. Пискарев. – Н.Новгород, 2009. – 274 с.

83. Новиков, В.В. Растворимые формы мембранных белков клеток иммунной системы [Текст] / В.В. Новиков, А.В. Караулов, А.Ю. Барышников. – М.: МИА, 2008. – 249 с.
84. Новый метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов [Текст] / И.В. Вальшева [и др.] // Журнал микробиологии. – 2003. – № 4. – С. 64-67.
85. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений [Электронный ресурс] : приказ МЗ СССР от 22.04.1985 № 535. – Режим доступа: <http://base.garant.ru/4171962/>. – Дата обращения: 26.01.2017.
86. Образование биопленок – пример «социального» поведения бактерий [Текст] / Ю.М. Романова [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 556-561.
87. Овчаренко, С.И. Рофлумиласт в лечении больного хронической обструктивной болезнью легких тяжелого течения с полиморбидной патологией [Электронный ресурс] / С.И. Овчаренко, Я.К. Галецкайте // Лечащий врач. – 2013. – №5. – Режим доступа: <http://www.lvrach.ru/2013/05/15435709/>. – Дата обращения: 26.01.2017.
88. Одинцова, О.В. Лизоцимная и антилизоцимная активности культур коринеформных бактерий влагалища [Текст] / О.В. Одинцова // Казанский медицинский журнал. – 2002. – Т. 83, № 1. – С. 60 - 62.
89. Одышка и ассоциированные синдромы: межрегиональный сборник научных трудов [Текст] / под ред. В.Н. Абросимова. – Рязань, 2014. – Выпуск 5. – 224 с.
90. Олексин, А.В. Экологически важные свойства популяций микроорганизмов [Текст] / А.В. Олексин // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – №8. – С. 7-12.
91. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [Электронный ресурс] : методические указания

МУК 4.2.1890-04. – Введ. 4.03.2004 г. – Режим доступа: <http://base.garant.ru/4180783/>. – Дата обращения: 26.01.2017.

92. Опыт ведения больных хронической обструктивной болезнью легких, сотрудников промышленного предприятия [Текст] / Е.Г. Чунтыжева [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2008. – № 3. – С. 52-62.

93. Особенности этиологической структуры и факторов персистенции бактерий, выделенных при инфекции нижних мочевых путей и хроническом бактериальном простатите [Текст] / Ю.Л. Набока [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 5. – С. 8-12.

94. Оценка адгезивных свойств коринебактерий дифтерии: пособие для врачей [Текст] / Е.В. Беляева [и др.]. – Н. Новгород, 1999. – 10 с.

95. Оценка персистентных свойств микрофлоры дыхательных путей при респираторных заболеваниях [Текст] / Г.К. Дегтева [и др.] // РЭТ – Инфо. – 2006. – №3. – С.54.

96. Пазыч, С.А. Маркеры активации и гибель клеток индуцированной мокроты при бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.43 / Светлана Анатольевна Пазыч. – Владивосток, 2005. – 23 с.

97. Паршута, Л.И. Особенности формирования микробного биоценоза слизистой оболочки носа при стафилококковом бактерионосительстве [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Лариса Игоревна Паршута. – Оренбург, 1998. - 23 с.

98. Перельман, Ю.М. Spiroграфическая диагностика нарушений вентиляционной функции легких: пособие для врачей [Текст] / Ю.М. Перельман, А.Г. Приходько. – Издание 2-е, доп.– Благовещенск, 2013. – 44 с.

99. Перспективы фармакотерапии хронической обструктивной болезни легких: возможности комбинированных бронходилататоров и место ингаляционных глюкокортикостероидов. Заключение совета экспертов [Текст] / С.Н. Авдеев [и др.] // Пульмонология. – 2016. – Т. 26, № 1. – С. 65-72.

100. Пешкова, О.А. Амбулаторное лечение больных с сочетанием хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы [Текст] : дис. ...канд. мед. наук : 14.00.43 / Ольга Александровна Пешкова. – М., 2002. – 154 с.
101. Постникова, Л.Б. Иммуно-биохимические механизмы системного воспаления в патогенезе хронической обструктивной болезни легких [Текст] : дис. ...д-ра мед. наук : 14.00.05 / Лариса Борисовна Постникова. – Н. Новгород, 2005. – 232 с.
102. Пронина Е.Ю. Вершина айсберга: эпидемиология ХОБЛ (обзор литературы) [Текст] / Е.Ю. Пронина // Вестник современной клинической медицины. – 2011. – Т.4, №3. – С. 18-23.
103. Пругер, И.В. Нарушения микробиоценоза ротоглотки и дыхательных путей у больных внебольничной пневмонией и их коррекция [Текст] : автореф. дис. ... канд.мед.наук: 14.00.43 / Ирина Владимировна Пругер. – Иваново, 2009. - 23 с.
104. Пульмонология. Национальное руководство. Краткое издание [Текст] / В.Н. Абросимов [и др.]; под ред. акад. РАМН А.Г. Чучалина. – М. : Геотар-Медиа, 2013. – 767 с.
105. Распространенность хронической обструктивной болезни легких в крупном промышленном центре (Нижний Новгород) [Текст] / Л.Б. Постникова [и др.] // Пульмонология. – 2011. – №2. – С. 5-8.
106. Растворимые ассоциаты молекул адгезии CD54 и CD18 в сыворотке крови человека [Текст] / В.В. Новиков [и др.] // Иммунология. – 2008. – Т. 29, № 4. – С. 220-223.
107. Растворимые формы дифференцировочных антигенов в сыворотке крови больных гепатитом С [Текст] / Т.В. Вишневская [и др.] // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 33-40.0
108. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально - значимых заболеваниях. Исследование их роли при вирусных инфекциях. Сообщение II [Текст] / В.В. Новиков [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 131-142.

109. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA [Текст] / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
110. Симонова, Е.В. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека [Текст] / Е.В. Симонова, О.А. Пономарева // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2008. – Т. 83, № 8. – С. 20 – 25.
111. Синопальников, А.И. Современный взгляд на фармакотерапию обострений хронической обструктивной болезни легких [Электронный ресурс] / А.И. Синопальников, А.А. Зайцев // Лечащий врач. – 2009. – №10. – Режим доступа: <http://www.lvrach.ru/2009/10/10866825/>. – Дата обращения: 26.01.2017.
112. Синтез лизоцима и его инактивация микроорганизмами, выделенными от больных с различными нозологическими формами [Электронный ресурс] / О.В. Бойко [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3. – Режим доступа: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=13101>. – Дата обращения: 26.01.2017.
113. Смертность населения по причинам смерти в 2015 году [Электронный ресурс] / Федеральная служба государственной статистики. – Режим доступа: <http://www.gks.ru/>. – Дата обращения: 15.05.2016.
114. Современные представления о роли CD38 в патогенезе [Текст] / И.А. Соловьева [и др.] // Пульмонология. – 2013. – № 5. – С. 81-84.
115. Содержание антигенных детерминант CD16, CD25, CD95 и HLA DR в индуцированной мокроте больных бронхиальной астмой и хроническим обструктивным бронхитом [Текст] / В.А. Невзорова [и др.] // Терапевтический архив. – 2003. - № 11. – С.61-64.
116. Содержание растворимого CD95-антигена и CD95+-моноклеарных клеток в биологических жидкостях больных с хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / Н.И. Кубышева [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – №3. – С. 22-23.

117. Соловьева, И.В. Микробиологические основы коррекции "дисбиозной" микробиоты человека [Текст] : дис. ...д-ра биол. наук : 03.02.08 / Ирина Владленовна Соловьева. – Н. Новгород, 2013. – 289 с.

118. Соодаева, С.К. Нарушения окислительного метаболизма при заболеваниях респираторного тракта и современные подходы к антиоксидантной терапии [Текст] / С.К. Соодаева, И.А. Климанов // Практическая пульмонология. – 2009. – № 1. – С. 34-38.

119. Соодаева, С.К. Свободорадикальные механизмы повреждения при болезнях органов дыхания [Текст] / С. К. Соодаева // Пульмонология. – 2012. – №1. – С. 5-10.

120. Способ определения антииммуноглобулиновой активности микроорганизмов [Электронный ресурс] : пат. 2236465 Рос. Федерация, МПК C12Q1/02, G01N33/569 / О.В. Бухарин [и др.] ; заявитель и патентообладатель Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН. – № 2002125474/13; заявл. 24.09.2002; опубл. 20.09.2004, Бюл. 26. – Режим доступа: http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1485454205124. – Дата обращения: 26.01.2017.

121. Способ определения растворимой формы димера CD38 антигена в сыворотке крови человека [Электронный ресурс] : пат. 2261445 Рос. Федерация, МПК G01N/33/53 / Н.И. Егорова, В.В. Новиков, Г.Ю. Курников ; заявитель и патентообладатель Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. - №2002132789/15; заявл. 05.12.2002; опубл. 27.09.2005, Бюл. 27. – Режим доступа: http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1485454433127. – Дата обращения: 26.01.2017.

122. Способ определения растворимой формы димера CD50 антигена в сыворотке крови человека [Электронный ресурс] : пат. 2416800 Рос. Федерация, МПК G01N33/53 / А.А. Бабаев, В.В. Новиков, Д.И. Князев ; заявитель и патентообладатель ННГУ им Н.И. Лобачевского. – №2009143185/15; заявл. 23.11.2009; опубл. 20.04.2011, Бюл. 11. – Режим доступа:

http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1485454549892. – Дата обращения: 26.01.2017.

123. Способ определения функционального состояния клеточного звена иммунной системы у пациентов с термической травмой [Электронный ресурс] : пат. 2176795 Рос. Федерация, МПК G01/N33/53 / М.Ю. Лебедев [и др.]; заявитель и патентообладатель Нижегородский государственный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии. – №2000125448/14; заявл. 09.10.2000; опубл. 10.12.2001, Бюл. 34. – Режим доступа: http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1485454881075. – Дата обращения: 26.01.2017.

124. Способ прогнозирования тяжести течения хронической обструктивной болезни легких [Электронный ресурс] : пат. 2522678 Рос. Федерация, МПК G01N33/50 / Л.М. Огородова [и др.] ; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. – № 2012134940/15; заявл. 15.08.2012, опубл. 20.02.2014, Бюл. №5. – Режим доступа: http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1485455018914. – Дата обращения: 26.01.2017.

125. Способ прогнозирования тяжести хронических воспалительных заболеваний нижних дыхательных путей микробной этиологии [Электронный ресурс] : пат. 2276361 Рос. Федерация, МПК G01N33/53 / Г.К. Дегтева [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГУН ННИИЭМ им.академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. - № 2004122347/15 ; заявл. 20. 07. 2004; опубл. 10.05.2006, Бюл. №13. – Режим доступа: http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1485455276658. – Дата обращения: 26.01.2017.

126. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории [Электронный ресурс] : методические указания МУ 4.2.2039-05. – Введ. 23.12.2005 г. – Режим доступа: <http://base.garant.ru/4183055/>. – Дата обращения: 08.09.2016

127. Урясьев, О.М. Коморбидность в клинике внутренних болезней [Текст] / О.М. Урясьев, В.Я. Гармаш // Сочетанная патология в клинической практике: сб.

науч. трудов, посвященный 70-летию кафедры факультетской терапии. – Рязань, 2013. – С. 7-12.

128. Урясьев, О.М. Сочетание бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни лёгких: особенности этиологии, патогенеза, диагностики, фармакотерапии [Текст] / О.М. Урясьев, С.В. Фалетрова, Л.В. Коршунова // Казанский медицинский журнал. – 2016. – Т. 97, № 3. – С. 394-400.

129. Участие растворимых молекул HLA I класса, CD8 и их комплексов в развитии хронической обструктивной болезни легких [Текст] / Н.И. Кубышева [и др.] // Иммунология. – 2010. – №2. – С. 97-99.

130. Факторы, способствующие персистенции условно-патогенных микроорганизмов [Текст] / Л.В. Михайлова [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – Т. 36, № 4. – С. 76-79.

131. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких [Текст] / А.Г. Чучалин [и др.] // Пульмонология. – 2014. – №3. – С. 15-54.

132. Формирование биопленок *Legionella spp.* в эксперименте [Текст] / Т.И. Карпова [и др.] // Журнал микробиологии. – 2008. – № 1. – С. 3-7.

133. Фрейдлин, И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции / И.С. Фрейдлин [Текст] // Медицинская Иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 347-354.

134. Хаитов, Р.М. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека [Текст] / Р.М. Хаитов, Л.П. Алексеев // Иммунология. – 2001. – № 3. – С. 4-12.

135. Хамитов, Р. Антимикробная химиотерапия при хронической обструктивной болезни легких [Текст] / Р. Хамитов, Л. Пальмова // Врач. – 2005. – № 10. – С. 29-30.

136. Характеристика микробиоценозов слизистой оболочки носа и миндалин как один из экологических показателей здоровья человека [Текст] / Л.М. Хуснутдинова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2009. – №4. – С. 80–82.

137. Характеристика микрофлоры, выделенной при острых воспалительных заболеваниях легких и плевры [Текст] / О.М. Абрамзон [и др.] // Журнал микробиологии. – 2003. – № 4. – С. 44-47.
138. Хроническая обструктивная болезнь легких: бактериальный и микотический пейзаж при анализе мокроты [Текст] / В.И. Никуличева [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2007. – Т. 2, № 2. – С. 55-56.
139. Хроническая обструктивная болезнь легких: монография [Текст] / под ред. акад. РАМН А.Г. Чучалина. – М. : Атмосфера, 2008. – 568 с.
140. Чеботарь, И.В. Нейтрофилы и бактериальные биопленки: диалектика взаимоотношений [Текст] / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – № 6. – С. 105–112.
141. Черняев, А.Л. Патологическая анатомия хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы: сходства и различия [Текст] / А.Л. Черняев, М.В. Самсонова // Практическая пульмонология. – 2013. – № 1. – С. 55-60.
142. Чучалин, А.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания [Текст] / А.Г. Чучалин // Терапевт. арх. – 2013. – № 8. – С. 44-48.
143. Шевцов, В. В. Микрофлора нижних дыхательных путей у больных раком легких и хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / В.В. Шевцов, А.Н. Жакот, С.Д. Митрохин // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2012. – № 4. – С. 87-92.
144. Шмелев, Е.И. Бактериальная иммунокоррекция при хроническом бронхите и хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / Е.И. Шмелев // Практическая пульмонология. – 2005. - № 1. – С. 35-38.
145. Шония, М.Л. Влияние курения в юношеском возрасте на изменения антиоксидантной активности и иммунного ответа как предикторов хронической обструктивной болезни легких [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед.наук: 14.01.04 / Моника Левановна Шония. – Н.Новгород, 2014. – 18 с.

146. Шпрыков, А.С. Клиника и эффективность лечения туберкулеза и бактериальных заболеваний легких в условиях хронической табачной интоксикации (экспериментальные и клинические исследования [Текст]: автореф. дис. ...д-ра мед. наук: 14.01.16 / Александр Сергеевич Шпрыков. – М., 2011. – 46 с.
147. Эпидемиологические особенности хронических респираторных заболеваний в разных климатогеографических регионах России [Текст] / М.Г. Гамбарян, [и др.] // Пульмонология. – 2014. – №3. – С. 55-61.
148. Эпидемиология хронической обструктивной болезни легких [Текст] / Ю.Н. Краснова [и др.] // Практическая пульмонология. – 2006. – №1. – С.54-56.
149. Этиологическая роль энтерококков при хроническом обструктивном бронхите [Текст] / В.И. Седов [и др.] // Журнал микробиологии. – 1993. – № 3. – С. 27-30.
150. Яковлев, С.В. Клинико-микробиологическое обоснование выбора антибактериальных препаратов при обострении хронического бронхита [Текст] / С.В. Яковлев // Инфекция и антимикробная терапия. – 2000. – №2. – С. 54-58.
151. Ярилин, А.А. Апоптоз и его роль в целостном организме [Текст] / А.А. Ярилин // Глаукома. – 2003. – № 2. — С. 46-54.
152. A 1-Year Prospective Study of the Infectious Etiology in Patients Hospitalized With Acute Exacerbations of COPD [Text] / F.W. Ko [et al.] // Chest. – 2007. – Vol. 131, № 1. – P. 44-52.
153. A Genome-Wide Association Study of Emphysema and Airway Quantitative Imaging Phenotypes [Text] / M.H. Cho [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2015. – Vol. 192, № 5. – P. 559-569.
154. Acute Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae infections in community acquired pneumonia and exacerbations of COPD or asthma: therapeutic considerations [Text] / F. Meloni [et al.] // J Chemother. – 2004. – Vol. 16. – P. 70–76.
155. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1-antitrypsin [Text] / R. Dhimi [et al.] // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2000. – Vol. 22, № 2. – P. 244–252.

156. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers [Text] / M. Bafadhel [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2011. – Vol. 184, № 6. – P. 662-671.

157. Acute-phase protein alpha1-antitrypsin inhibits neutrophil calpain I and induces random migration [Text] / M. Al-Omari [et al.] // *Mol Med.* – 2011. – Vol. 17, № 9–10. – P. 865–874. .

158. Additive anti-inflammatory effects of beta 2 adrenoceptor agonists or glucocorticosteroid with roflumilast in human peripheral blood mononuclear cells [Text] / S.L. Tannheimer [et al.] // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2012. – Vol. 25, № 2. – P. 178-184.

159. Additive anti-inflammatory effects of corticosteroids and phosphodiesterase-4 inhibitors in COPD CD8 cells [Text] / S. Grundy [et al.] // *Respir Res.* – 2016. – Vol. 17, № 1. – P.9.

160. Adhesion molecules in subjects with COPD and healthy non-smokers: a cross sectional parallel group study [Text] / K. Blidberg [et al.] // *Respir Res.* – 2013. – Vol. 14, № 1. – P. 47.

161. Adhesion molecules, endothelin-1 and lung function in seven population-based cohorts [Text] / E.C. Oelsner [et al.] // *Biomarkers.* – 2013. – Vol. 18, № 3. – P. 196-203.

162. Airway bacterial load and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease [Text] / T.M. Wilkinson [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2003. – Vol. 167, № 8. – P. 1090-1095.

163. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / S. Sethi [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 173. – P. 991-998.

164. Airway inflammation in nonobstructive and obstructive chronic bronchitis with chronic *Haemophilus influenzae* airway infection. Comparison with noninfected patients with chronic obstructive pulmonary disease [Text] / P. Bresser [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2000. – Vol. 162. – P. 947–952.

165. Altered CD38/Cyclic ADP-Ribose Signaling Contributes to the Asthmatic Phenotype [Text] / J.A. Jude [et al.] // *J Allergy (Cairo)*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 289468. – 8 p.
166. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers [Text] / R. Finkelstein [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 1995. – Vol.152. – P. 1666-1672.
167. Alveolar macrophage dynamics in murine lung regeneration [Text] / K. Chamoto [et al.] // *J Cell Physiol*. – 2012. – Vol.227. – P. 3208–3215.
168. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases [Text] / R.E.K. Russell [et al.] // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2002. – Vol. 283, № 4. – P. L867–L873.
169. Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells [Text] / M. Yamaya [et al.] // *Arch Pharm Res*. – 2014. – Vol. 37, № 4. – P. 520-529.
170. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection [Text] / I. Retamales [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2001. – Vol. 164, № 3. – P. 469–473.
171. An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD [Text] / N.Yasuda [et al.] // *Respir Med*. – 1998. –Vol. 92, № 8. – P. 993-999.
172. Analysis of lower airway inflammation in a rabbit model of acute rhinosinusitis [Text] / A. Selcuk [et al.] // *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. – 2011. – Vol. 63, № 2. – P. 119-125.
173. Analysis of microbiota in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease [Text] / E. Aguirre [et al.] // *APMIS*. – 2015. – Vol. 123, № 5. – P. 427-432.
174. Analysis of sputum markers in the evaluation of lung inflammation and functional impairment in symptomatic smokers and COPD patients [Text] / G. Paone [et al.] // *Dis Markers*. – 2011. – Vol. 31, № 2. – P. 91–100.
175. Anthonisen, NR. The British hypothesis revisited [Text] / N.R. Anthonisen // *Eur Respir J*. – 2004. – Vol. 23, № 5. – P. 657-658.

176. Antimicrobial treatment of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease: 2007 consensus statement [Article in Spanish] [Text] / M. Miravittles [et al.] // Arch Bronconeumol. – 2008. – Vol. 44, № 2. – P. 100-108.

177. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis [Text] / A.T. Hill [et al.] // Am J Med. – 2000. – Vol. 109, № 4. – P. 288-295.

178. Association of blood eosinophils and plasma periostin with FEV1 response after 3-month inhaled corticosteroid and long-acting beta2-agonist treatment in stable COPD patients [Text] / H.Y. Park [et al.] // Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. – 2015. – Vol. 22, № 11. – P. 23-30.

179. Associations between indicators of nitrosative stress and levels of soluble HLA-I, CD95 molecules in patients with COPD [Text] / N. Kubysheva [et al.] // COPD. – 2014. – Vol. 11, № 6. – P. 639-644.

180. Asthma control in elderly asthmatics. An Italian observational study [Text] / M. Milanese [et al.] // Respir. Med. – 2014. – Vol. 108. – P. 1091–1099.

181. Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease: clinical and experimental evidence [Text] / F. Kheradmand [et al.] // Expert Rev Clin Immunol. – 2012. – Vol. 8, № 3. – P. 285–292.

182. Babu, K.S. Inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a pro–con perspective [Text] / K.S. Babu, J.A. Kastelik, J.B. Morjaria // Br J Clin Pharmacol. – 2014. – Vol. 78, № 2. – P. 282–300.

183. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study [Text] / H. Cabello [et al.] // Eur Respir J. – 1997. – Vol. 10. – P. 1137-1144.

184. Barnes, P.J. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / P.J. Barnes // Clin Chest Med. – 2014. – Vol. 35, № 1. – P. 71-86.

185. Barnes, P.J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease [Text] / P.J. Barnes // J Allergy Clin Immunol. – 2013. – Vol. 131, № 3. – P. 636-645.

186. Barrecheuren, M. The asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome (ACOS): opportunities and challenges [Text] / M. Barrecheuren, C. Esquinas, M. Miravittles // *Curr Opin Pulm Med.* – 2015. – Vol. 21, №1. – P. 74-79.

187. Beta2-adrenoceptor stimulation inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells [Text] / Takahashi H.K. [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2010. – Vol. 627, № 1-3. – P. 313-317.

188. Blocking pulmonary ICAM-1 expression ameliorates lung injury in established diet-induced pancreatitis [Text] / A.H. Lundberg [et al.] // *Annals of Surgery.* – 2001. – Vol. 233, № 2. – P. 213–220.

189. Blood Eosinophils: A Biomarker of Response to Extrafine Beclomethasone/Formoterol in Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Text] / S.H. Siddiqui [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2015. – Vol. 192, № 4. – P. 523–525.

190. Blood transfusions with high levels of contaminating soluble HLA-I correlate with levels of soluble CD8 in recipients' plasma; a new control factor in soluble HLA-I-mediated transfusion-modulated immunomodulation? [Text] / M. Ghio [et al.] // *Blood Transfus.* – 2014. – Vol. 12 (Suppl. 1). – P. s105-108.

191. Bovine CD14 receptor produced in plants reduces severity of intramammary bacterial infection [Text] / L.G. Nemchinov [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, № 9. – P. 1345-1351.

192. Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation [Text] / N. Soler [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 1998. – Vol. 157. – P. 1498-1505.

193. Burney, P. The global burden of chronic respiratory disease in adults [Text] / P. Burney, D. Jarvis, R.Perez-Padilla // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2015. – Vol. 19. – P.10–20

194. Caramori, G. Role of transcription factors in the pathogenesis of asthma and COPD [Text] / G. Caramori, P. Casolari, I. Adcock // *Cell Commun Adhes.* – 2013. – Vol. 20, № 1–2. – P. 21–40.

195. CD14 is an acute-phase protein [Text] / S. Bas [et al.] // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 4470–4479.
196. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition [Text] / M.S. von Bergwelt-Baildon [et al.] // *Blood.* – 2006. – Vol. 108. – P. 228–237.
197. CD38 and airway hyper-responsiveness: studies on human airway smooth muscle cells and mouse models [Text] / A.G. Guedes [et al.] // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2015. – Vol. 93, № 2. – P. 145-153.
198. CD38 plays a dual role in allergen-induced airway hyperresponsiveness [Text] / F. Gally [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2009. – Vol. 40, № 4. – P. 433-442.
199. Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier [Text] / M. Abadier [et al.] // *Eur J Immunol.* – 2015. – Vol. 45, № 4. – P. 1043-1058.
200. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry [Text] / C.H. Bosken [et al.] // *Am Rev Respir Dis.* – 1992. – Vol. 145. – P. 911–917.
201. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers [Text] / S.S. Salvi, P.J. Barnes // *Lancet.* – 2009. – Vol. 374, № 9691. – P. 733-743.
202. Chronic productive cough is associated with death in smokers with early COPD [Text] / N. Putha [et al.] // *COPD.* – 2014. – Vol. 11, №4. – P.451-458.
203. Chuchalin, A.G. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation [Text] / A.G. Chuchalin // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2014. – Vol.9. – P.963-974.
204. Chung, K.F. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction [Text] / K.F. Chung, I.M. Adcock // *Eur. Respir. J.* – 2008. – Vol. 31, №6. – P. 1334 - 1356.

205. Cigarette smoke increases BLT2 receptor functions in bronchial epithelial cells: in vitro and ex vivo evidence [Text] / E. Pace [et al.] // *Immunology*. – 2013. – Vol. 139, № 2. – P. 245-255.

206. Cigarette Smoke-Induced Collagen Destruction; Key to Chronic Neutrophilic Airway Inflammation? [Text] / S.A. Overbeek [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. e55612.

207. Circulating cell adhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis [Text] / G.C. Riise [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 1994. – Vol. 7, № 9. – P. 1673-1677 .

208. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients [Text] / R. Aldonyte [et al.] // *Respir Res.* – 2003. – Vol. 4. – P. 11.

209. Circulating sICAM-1 and sE-Selectin as biomarker of infection and prognosis in patients with systemic inflammatory response syndrome [Text] / R. de Pablo [et al.] // *Eur J Intern Med.* – 2013. – Vol. 24, № 2. – P. 132-138.

210. Clinical indications for non-invasive positive pressure ventilation in chronic respiratory failure due to restrictive lung disease, COPD, and nocturnal hypoventilation – a consensus conference report [Text] // *Chest.* – 1999. – Vol. 116, № 2. – P. 521–534.

211. Compare the efficacy of inhaled budesonide and systemic methylprednisolone on systemic inflammation of AECOPD [Text] / X. Sun [et al.] // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2015. – Vol. 31. – P. 111–116.

212. Comparison of nebulized budesonide and oral prednisolone with placebo in the treatment of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial [Text] / F. Maltais [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2002. – Vol. 165, № 5. – P.698-703.

213. Comparison of non-invasive ventilation and standard medical therapy in acute hypercapnic respiratory failure: a randomised controlled study at a tertiary health centre in SE Turkey [Text] / O. Dikensoy [et al.] // *International Journal of Clinical Practice.* – 2002. – Vol. 56. – P. 85–88.

214. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers [Text] / A. Morris [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2013. – Vol. 187, № 10. – P. 1067-1075.

215. Correct use of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a consensus document [Text] / B. Alcázar Navarrete [et al.] // *Arch Bronconeumol.* – 2015. – Vol. 51, № 4. – P. 193-198.

216. Correlation between peripheral blood T-cell profiles and clinical and inflammatory parameters in stable COPD [Text] / T. Shirai [et al.] // *Allergol Int.* – 2010. – Vol. 59. – P. 75–82.

217. Cosio, M.G. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Text] / M.G. Cosio, M. Saetta, A. Agusti // *N Engl J Med.* – 2009. – Vol. 360. – P. 2445-2454.

218. Current concepts in targeting chronic obstructive pulmonary disease pharmacotherapy: making progress towards personalised management [Text] / P.G. Woodruff [et al.] // *Lancet.* – 2015. – Vol. 385, № 9979. – P. 1789-1798.

219. Cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell responses to non-typeable *Haemophilus influenza* [Text] / P.T. King [et al.] // *Clin Exp Immunol.* – 2008. – № 3. – P. 542-551.

220. Davies, L. Oral corticosteroids in patients admitted to hospital with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a prospective randomized controlled trial [Text] / L. Davies, R.M. Angus, P.M. Calverley // *Lancet.* – 1999. – Vol. 354. – P. 456-460.

221. Davoine, F. Eosinophil Cytokines, Chemokines, and Growth Factors: Emerging Roles in Immunity [Text] / F. Davoine, P. Lacy // *Front Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 570.

222. Deformability and CD11/CD18 expression of sequestered neutrophils in normal and inflamed lungs [Text] / D.M. Brown [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 13, № 5. – P. 531-539.

223. Detection of multiple viral and bacterial infections in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a pilot prospective study [Text] / J.M. Perotin [et al.] // *J. Med. Virol.* – 2013. – Vol. 85, № 5. – P. 866–873.

224. Determinants of bacteriological outcomes in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / S. Sethi [et al.] // *Infection.* – 2016. – Vol. 44, № 1. – P. 65-76.

225. Diagnosis of Diseases of Chronic Airflow Limitation: Asthma, COPD and Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS), updated 2015 [Electronic resource]. – URL: <http://goldcopd.org/asthma-copd-asthma-copd-overlap-syndrome>. – Access: 26.01.2017.

226. Different proteolytic mechanisms involved in Fc gamma RIIIb shedding from human neutrophils [Text] / P.J. Middelhoven [et al.] // *Clin Exp Immunol.* – 2001. – Vol. 125, № 1. – P. 169-175.

227. Differential activation of killer cells in the circulation and the lung: a study of current smoking status and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [Text] / J. Wang [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 3. – P. e58556.

228. Diminished ICAM-1 Expression and Impaired Pulmonary Clearance of Nontypeable *Haemophilus influenzae* in a Mouse Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease/Emphysema [Text] / B. Pang [et al.] // *Infect Immun.* – 2008. – Vol. 76, № 11. – P. 4959–4967.

229. Downregulation of the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 on bronchial epithelial cells by fenoterol, a beta2-adrenoceptor agonist [Text] / S. Oddera [et al.] // *J Asthma.* – 1998. – Vol. 35, № 5. – P. 401-408.

230. Effect of a Dose-Escalation Regimen for Improving Adherence to Roflumilast in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Text] / H. Hwang [et al.] // *Tuberc Respir Dis (Seoul).* – 2015. – Vol.78, № 4. – P. 321-325.

231. Effect of infliximab on local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a pilot study [Text] / M.A. Dentener [et al.] // *Respiration.* – 2008. – Vol. 76, № 3. – P. 275–282.

232. Effect of oral glucocorticoid treatment on serum inflammatory markers in acute asthma [Text] / A. Sahid El-Radhi [et al.] // Arch Dis Child. – 2000. – Vol. 83, № 2. – P. 158-162.

233. Effect of roflumilast on exacerbations in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease uncontrolled by combination therapy (REACT): a multicentre randomised controlled trial [Text] / F.J. Martinez [et al.] // Lancet. – 2015. – Vol. 385, № 9971. – P. 857-866.

234. Elliott, M.W. Noninvasive ventilation in acute exacerbations of COPD [Text] / M.W. Elliott // European Respiratory Review. – 2005. – Vol. 14, №94. – P. 39-42.

235. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke the effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response [Text] / B. Meshi [et al.] // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2002. – Vol. 26. – P. 52–57.

236. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / A. Noguera et al. // Thorax. – 2001. – Vol. 56. – P. 432-437.

237. Eosinophilic inflammation in COPD: prevalence and clinical characteristics [Text] / D. Singh [et al.] // Eur Respir J. – 2014. – Vol. 44, № 6. – P. 1697-1700.

238. Expression of Adhesion Molecules and G Proteins in Circulating Neutrophils in Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Text] / A. Noguera [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1998. – Vol. 158. – P. 1664-1668.

239. Factors associated with bronchiectasis in chronic obstructive pulmonary disease patients [Text] / M.A. Martínez-García [et al.] // Chest. - 2011. – Vol. 140. – P. 1130-1137.

240. Functional characterization of T cell populations in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / B.L. Eppert [et al.] // J Immunol. – 2013. – Vol. 190, № 3. – P. 1331-1340.

241. Gane, J. Mechanisms of neutrophil transmigration across the vascular endothelium in COPD [Text] / J. Gane, R. Stockley // Thorax. – 2012. – Vol. 67, № 6. – P. 553-561.

242. Garnock-Jones, K.P. Roflumilast: A Review in COPD [Text] / K.P. Garnock-Jones // *Drugs*. – 2015. – Vol. 75, № 14. – P. 1645-1656.
243. Garvey, C. Recent updates in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / C. Garvey // *Postgrad Med*. – 2015. – Vol. 1. – P. 1-10.
244. Gelb, A.F. Understanding the pathophysiology of the asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome [Text] / A.F. Gelb, S.A. Christenson, J.A. Nadel // *Curr Opin Pulm Med*. – 2016. – Vol. 22, № 2. – P. 100-105.
245. George, L. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease [Text] / L. George, C.E. Brightling // *Ther Adv Chronic Dis*. – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 34-51.
246. Global Health Observatory (GHO) data. Russian Federation: country profiles [Electronic resource] // World Health Organization. – URL: http://www.who.int/gho/countries/rus/country_profiles/en/ – Access: 26.01.2017.
247. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (Updated 2016). [Electronic resource]. – URL: <http://ginasthma.org/>. – Access: 26.01.2017.
248. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) (Updated 2016). [Electronic resource]. – URL: <http://goldcopd.org/>. – Access: 26.01.2017.
249. Greenlee, K.J. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted [Text] / K.J. Greenlee, Z. Werb, F. Kheradmand // *Physiol Rev*. – 2007. – Vol. 87, №1. – P. 69-98.
250. Heaney, M.L. Soluble receptors in human disease [Text] / M.L. Heaney, D.W. Golde // *J Leukoc Biol*. – 1998. – Vol. 64, № 2. – P. 135-146.
251. Herath, S.C. Prophylactic antibiotic therapy for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [Text] / S.C. Herath, P. Poole // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2013. – Rev. 11. – CD009764.
252. High ICAM-1 gene expression in pulmonary fibroblasts of COPD patients: a reflection of an enhanced immunological function [Text] / A. Zandvoort [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2006. – Vol. 28, № 1. – P. 113-122.

253. Hospitalized exacerbations of COPD: risk factors and outcomes in the ECLIPSE cohort [Text] / H. Müllerova [et al.] // *Chest*. – 2015. – Vol. 147, № 4. – P. 999-1007.

254. Human CD56+ Cytotoxic Lung Lymphocytes Kill Autologous Lung Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Text] / C.M. Freeman [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, №7. – P. e103840.

255. IL-25 regulates the expression of adhesion molecules on eosinophils: mechanism of eosinophilia in allergic inflammation [Text] / P.F. Cheung [et al.] // *Allergy*. – 2006. – Vol. 61, № 7. – P. 878-885.

256. Imbalanced secretion of IL-1beta and IL-1RA in Chlamydia pneumoniae-infected mononuclear cells from COPD patients [Text] / J. Rupp [et al.] // *Eur Respir J*. – 2003. – Vol. 22. – P. 274-279.

257. Immunopathology of the small-airway submucosa in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease [Text] / B.E. Lams [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 1998. – Vol. 158. – P. 1518-1523.

258. Impaired phagocytosis of nontypeable Haemophilus influenzae by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / C.S. Berenson [et al.] // *J Infect Dis*. – 2006. – Vol. 194, №10. – P. 1375-1384.

259. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD [Text] / A. Di Stefano [et al.] // *Eur Respir J*. – 2002. – Vol. 20, № 3. – P. 556-563.

260. Increased intraepithelial (CD103+) CD8+ T cells in the airways of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease [Text] / M.Mikko [et al.] // *Immunobiology*. – 2013. – Vol. 218, № 2. – P. 225-231.

261. Increased levels of soluble ICAM-1 in chronic obstructive pulmonary disease and resistant smokers are related to active smoking [Text] / J.L. Lopez-Campos [et al.] // *Biomark Med*. – 2012. – Vol. 6, № 6. – P. 805-811.

262. Increased levels of soluble interleukin-6 receptor and CCL3 in COPD sputum [Text] / A.K. Ravi [et al.] // *Respir Res*. – 2014. – Vol. 15, №1. – P. 103.

263. Increased number of alveolar macrophages expressing adhesion molecules of the leukocyte adhesion molecule family in smoking subjects. Association with cell-binding ability and superoxide anion production [Text] / T. Schaberg [et al.] // *American Review of Respiratory Diseases*. – 1992. – Vol. 146. – P. 1287-1293.

264. Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways [Text] / K. Lolmede [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2009. – Vol. 85. – P. 85.

265. Inhibitory effects of tiotropium on rhinovirus infection in human airway epithelial cells [Text] / M. Yamaya [et al.] // *Eur Respir J*. – 2012. – Vol. 40, № 1. – P. 122-132.

266. Intercellular adhesion molecule 1 and progression of percent emphysema: The MESA Lung Study [Text] / C.P. Aaron [et al.] // *Respir Med*. – 2014. – Vol. 109, № 2. – P. 255-264.

267. Intercellular adhesion molecule 1 and tumor necrosis factor alpha in asthma and persistent allergic rhinitis: relationship with disease severity [Text] / M. Gorska-Ciebiada [et al.] // *Ann Allergy Asthma Immunol*. – 2006. – Vol. 97, № 1. – P. 66-72.

268. Is pesticide exposure a cause of obstructive airways disease? [Text] / E. Doust [et al.] // *Eur Respir Rev*. – 2014. – Vol. 23, № 132. – P. 180-192.

269. Kanner, R.E. Lung Health Study Research Group. Lower respiratory illnesses promote FEV₁ decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease: results from the lung health study [Text] / R.E. Kanner, N.R. Anthonisen, J.E. Connett // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2001. – Vol. 164, № 3. – P. 358-364.

270. Kanoh, S. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications [Text] / S. Kanoh, B. Rubin // *Clin Microbiol Rev*. – 2010. – Vol. 23, № 3. – P. 590-615.

271. Kent, B.D. Hypoxemia in patients with COPD: cause, effects, and disease progression [Text] / B.D. Kent, P.D. Mitchell, W.T. McNicholas // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. – 2011. – Vol. 6. – P. 199-208.

272. Kew, K.M. Inhaled steroids and risk of pneumonia for chronic obstructive pulmonary disease [Text] / K.M. Kew, A. Seniukovich // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2014. – Rev. 3. – CD010115.

273. Kim, W.J. Candidate genes for COPD: current evidence and research [Text] / W.J. Kim, S.D. Lee // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2015. – Vol. 10. – P. 2249-2255.

274. Kitaguchi, Y. Sputum eosinophilia can predict responsiveness to inhaled corticosteroid treatment in patients with overlap syndrome of COPD and asthma [Text] / Y. Kitaguchi, Y. Komatsu, K. Fujimoto // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2012. – Vol. – P. 283-289.

275. Kobayashi, S.D. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach [Text] / S.D. Kobayashi, F.R. De Leo // *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* – 2009. – Vol. 1, № 3. – P. 309–333.

276. Laszlo, G. Standardisation of lung function testing: helpful guidance from the ATS/ERS Task Force [Text] / G. Laszlo // *Thorax.* – 2006. – Vol. 61, № 9. – P.744-746.

277. Lawson, C. ICAM-1 signaling in endothelial cells [Text] / C. Lawson, S.Wolf // *Pharmacol Rep.* – 2009. – Vol. 61, № 1. – P. 22-32.

278. Lee, I.T. Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases [Text] / I.T. Lee, C.M. Yang // *Mediators Inflamm.* – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 791231. – 12 p.

279. Lee, J.S. Serum levels of IL-8 and icam-1 as biomarkers for progressive massive fibrosis in coal workers' pneumoconiosis [Text] / J.S. Lee, J.H. Shin, B.S. Choi // *J Korean Med Sci.* – 2015. – Vol. 30, № 2. – P. 140-144.

280. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity [Text] / M.A. Freudenberg [et al.] // *Immunobiology.* – 2008. – Vol. 213, № 3-4. – P. 193-203.

281. Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 are increased in the bronchoalveolar lavage fluid of smokers [Text] / V. Regueiro [et al.] // *Eur Respir J.* – 2009. – Vol. 33, №2. – P. 273-281.
282. López-Campos, J.L. Global burden of COPD [Text] / J.L. López-Campos, W. Tan, J.B. Soriano // *Respirology.* – 2016. – Vol. 21, №1. – P.14-23.
283. Lund, F.E. Signaling properties of CD38 in the mouse immune system: enzyme-dependent and -independent roles in immunity [Text] / F.E. Lund // *Mol Med.* – 2006. – Vol. 12, № 11-12. – P. 328-333.
284. Majo, J. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema [Text] / J. Majo, H. Ghezzi, M.G. Cosio // *Eur Respir J.* – 2001. – Vol. 17, № 5. – P. 946-953.
285. Mammen, M.J. COPD and the microbiome [Text] / M.J. Mammen, S. Sethi // *Respirology.* – 2016. – Vol. 21, № 4. – P. 590-599.
286. Marsland, B.J. Host – microorganism interactions in lung diseases [Text] / B.J. Marsland, E.S. Gollwitzer // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – Vol. 14, № 12. – P. 827-835.
287. Masuda, M. Measurement of NK cell and macrophage activation [Article in Japanese] [Text] / M. Masuda, H. Takahashi // *Rinsho Byori.* – 2011. – Vol. 59, № 1. – P. 50-54.
288. Mathers, C.D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [Text] / C.D. Mathers, D. Loncar // *PLoS Med.* – 2006. – Vol. 3. – P. e442.
289. Matkovic, Z. Chronic bronchial infection in COPD. Is there an infective phenotype? [Text] / Z. Matkovic, M. Miravittles // *Respir Med.* – 2013. – Vol. 107. – P. 10–22.
290. Miravittles, M. Antibiotic prophylaxis in COPD: Why, when, and for whom? [Text] / M. Miravittles, A. Anzueto // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2015. – Vol. 32. – P. 119-123.
291. Miravittles, M. Role of infection in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / M. Miravittles, A. Anzueto // *Curr Opin Pulm Med.* – 2015. – Vol. 21, № 3. – P. 278-283.

292. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations [Text] / G.M. Hunninghake [et al.] // *N Engl J Med.* – 2009. - Vol. 361, №27. – P. 2599-2608.
293. Modulation of calcium signaling by interleukin-13 in human airway smooth muscle: role of CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose pathway [Text] / D.A. Deshpande [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2004. – Vol. 31. – P. 36-42.
294. *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response [Text] / T.F. Murphy [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2005. – Vol. 172, № 2. – P. 195-199.
295. Mortality and global health estimates. Global Health Observatory (GHO). [Electronic resource] / World Health Organization. – URL: http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/ – Access: 26.01.2017.
296. Muller, W.A. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration [Text] / W.A. Muller // *Annu Rev Pathol.* – 2011. – Vol. 14. – P. 323-344.
297. Nasal symptoms, airway obstruction and disease severity in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / J.R. Hurst [et al.] // *Clin Physiol Funct Imaging.* – 2006. – Vol. 26, № 4. – P. 251-256.
298. Nasobronchial interaction [Text] / C. Cingi [et al.] // *World J Clin Cases.* – 2015. – Vol. 3, № 6. – P. 499-503.
299. Natural killer T cells and the regulation of asthma [Text] / P. Matangkasombut [et al.] // *Mucosal Immunol.* – 2009. – Vol. 2, № 5. – P. 383-392.
300. Noninvasive ventilation in acute respiratory failure – a meta-analysis update [Text] / J.V. Peter [et al.] // *Crit Care Med.* – 2002. – Vol. 30. – P. 555-562.
301. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD [Text] / E. Bagdonas [et al.] // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. 995-1013.
302. O'Donnell, D.E. Physiology and consequences of lung hyperinflation in COPD [Text] / D.E. O'Donnell, P. Laveneziana // *Eur Respir Rev.* – 2006. – Vol. 15. – P. 61-67.
303. Occupational exposures and the risk of COPD: dusty trades revisited [Text] / P.D. Blanc [et al.] // *Thorax.* – 2009. – Vol. 64, № 1. – P. 6-12.

304. Oligomeric formylpeptide activity on human neutrophils [Text] / G. Cavicchioni [et al.] // *Eur J Med Chem.* – 2009. – Vol. 44, № 12. – P. 4926–4930.

305. Oligomerisation of soluble Fas antigen induced its cytotoxicity [Text] / O.V. Proussakova [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 36236–36241.

306. Othumpangat, S. Nerve growth factor modulates human rhinovirus infection in airway epithelial cells by controlling ICAM-1 expression [Text] / S. Othumpangat, M. Regier, G. Piedimonte // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2012. – Vol. 302, № 10. – P. L1057-1066.

307. Outcomes associated with corticosteroid dosage in critically ill patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / T.H. Kiser [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2014. – Vol. 189, № 9. – P. 1052-1064.

308. Pedersen, A.E. CD25 shedding by human natural occurring CD4+CD25+ regulatory T cells does not inhibit the action of IL-2 [Text] / A.E. Pedersen, J.P. Lauritsen // *Scand J Immunol.* – 2009. – Vol.70, № 1. – P. 40-43.

309. Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / X. Zhu [et al.] // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 5. – P. 3270-3277.

310. Plant, P.K. Early use of non-invasive ventilation for acute exacerbations of COPD on general respiratory wards: a multicentre randomised controlled trial [Text] / P.K. Plant, J.L. Owen, M.W. Elliott // *Lancet.* – 2000. – Vol. 355, № 9219. – P. 1931-1935.

311. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / R. Zalacain [et al.] // *Eur Respir J.* – 1999. – Vol. 13, № 2. – P. 343-348.

312. Prophylactic use of macrolide antibiotics for the prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation: a meta-analysis [Text] / W. Ni [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. e0121257.

313. Proportional classifications of COPD phenotypes [Text] / S.E. Marsh [et al.] // *Thorax.* – 2008. – Vol. 63. – P. 761-767.

314. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / T.F. Murphy [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2008. – Vol.177, № 8. – P. 853-860.
315. *Pseudomonas aeruginosa* isolates in severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization and risk factors [Text] / M. Gallego [et al.] // *BMC Pulm Med.* – 2014. – Vol. 14. – P. 103.
316. Rabe, K.F. Roflumilast for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / K.F. Rabe // *Expert Rev Resp Med.* – 2010. – Vol. 4. – P. 543-555.
317. Rangelov, K. Role of infections [Text] / K. Rangelov, S. Sethi // *Clin Chest Med.* – 2014. – Vol. 35, №1. – P. 87-100.
318. Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity [Text] / S. Partida-Sánchez [et al.] // *Immunity.* – 2004. – Vol. 20, № 3. – P. 279-291.
319. Regulation of ICAM-3 (CD50) membrane expression on human neutrophils through a proteolytic shedding mechanism [Text] / M.A. Del Pozo [et al.] // *Eur J Immunol.* – 1994. - Vol. 24, № 11. – P. 2586-2594.
320. Regulation of production of soluble Fc gamma receptors type III in normal and pathological conditions / I. Moldovan [et al.] // *Immunol Lett.* – 1999. – Vol. 68, № 1. – P. 125-134.
321. Regulation of the CD38 promoter in human airway smooth muscle cells by TNF- α and dexamethasone [Text] / K.G. Tirumurugaan [et al.] // *Respiratory Research.* – 2008. – Vol. 9. – P. 26.
322. Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease [Text] / D.J. Barker [et al.] // *BMJ.* – 1991. – Vol. 303, № 6804. – P. 671-675.
323. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations [Text] / I.S. Patel [et al.] // *Thorax.* – 2002. – Vol. 57, №9. – P.759-764.
324. Relationship between chronic nasal and respiratory symptoms in patients with COPD [Text] / N.J. Roberts [et al.] // *Respir Med.* – 2003. – Vol. 97, № 8. – P. 909-914.

325. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / G.C. Donaldson [et al.] // *Thorax*. – 2002. – Vol. 57, № 10. – P. 847-852.

326. Relationships among bacteria, upper airway, lower airway, and systemic inflammation in COPD [Text] / J.R. Hurst [et al.] // *Chest*. – 2005. – Vol. 127, № 4. – P. 1219-1226.

327. Remodeling in response to infection and injury. Airway inflammation and hypersecretion of mucus in smoking subjects with chronic obstructive pulmonary disease [Text] / P. Maestrelli [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2001. – Vol. 164. – P. S76-80.

328. Resident memory T cells (TRM) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity [Text] / R. Purwar [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. e16245.

329. Resolution of bronchial inflammation is related to bacterial eradication following treatment of exacerbations of chronic bronchitis [Text] / A.J. White [et al.] // *Thorax*. – 2003. – Vol. 58, № 8. – P. 680-685.

330. Respiratory syncytial virus, airway inflammation, and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease [Text] / T.M. Wilkinson [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2006. – Vol. 173. – P. 871–876.

331. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease [Text] / T. Seemungal [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2001. – Vol. 164, № 9. – P. 1618-1623.

332. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4 [Text] / L. Guillot [et al.] // *J Biol Chem*. – 2004. – Vol. 279. – P. 2712–2718.

333. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / P. Mallia [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2012. – Vol. 186, № 11. – P. 1117-1124.

334. Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis [Text] / E. Monso [et al.] // *Eur Respirat J.* – 1999. – Vol. 13. – P. 338-342.

335. Rodrigo G.J. Evaluation Rapid Effects of Inhaled Corticosteroids in Acute Asthma: An Evidence-Based Evaluation [Text] / G.J. Rodrigo // *Chest.* – 2006. – Vol. 130. – P. 1301-1311.

336. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials [Text] / P.M. Calverley [et al.] // *Lancet.* – 2009. – Vol. 374, № 9691. – P. 685-694.

337. Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs [Text] / M.C. Montoya [et al.] // *Nat Immunol.* – 2002. – Vol. 3, № 2. – P. 159-168.

338. Sapey, E. COPD exacerbations 2 : Aetiology [Text] / E. Sapey, R.A. Stockley // *Thorax.* – 2006. – Vol. 61, № 3. – P. 250-258.

339. Schönhofer, B. Non-invasive ventilation in the treatment of acute respiratory and chronic ventilatory failure [Article in German] [Text] / B. Schönhofer // *Dtsch Med Wochenschr.* – 2009. – Vol. 134, № 11. – P. 530-535.

340. Scott, D.A. The influence of tobacco smoking on adhesion [Text] / D.A. Scott, R.M. Palmer // *Tobacco Induced Diseases.* – 2002. – Vol. 1, № 1. – P.7-25.

341. Seasonal changes of proapoptotic soluble Fas ligand level in allergic rhinitis combined with asthma [Text] / G. Mezei [et al.] // *Pediatr Allergy Immunol.* – 2006. – Vol. 17, № 6. – P. 444-449.

342. Serum and bronchial lavage fluid concentrations of IL-8, SLPI, sCD14 and sICAM-1 in patients with COPD and asthma [Text] / C. Hollander [et al.] // *Respir Med.* – 2007. – Vol. 101, № 9. – P. 1947-1953.

343. Serum soluble CD23 and soluble CD25 in bronchial asthmatic patients [Text] / Y. Shiota [et al.] // *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* – 1993. – Vol. 31, №8. – P. 932-935.

344. Sethi, S. Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the-Art Review [Text] / S. Sethi, T.F. Murphy // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2001. – Vol. 14, № 2. – P. 336-363.

345. Sethi, S. Chronic obstructive pulmonary disease and infection. Disruption of the microbiome? [Text] / S. Sethi // *Ann. Am. Thorac. Soc.* – 2014. – Vol. 11 (Suppl. 1). – P. S43-47.
346. Sethi, S. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / S. Sethi, T.E. Murphy // *N Engl J Med.* – 2008. – Vol. 359. – P. 2355-2365.
347. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers [Text] / A. Di Stefano [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 1998. – Vol. 158, № 4. – P. 1277-1285.
348. Shao, M.X.G. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor- α -converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells [Text] / M.X.G. Shao, T. Nakanaga, J.A. Nadel // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2004. – Vol. 287, № 2. – P. L420-L427.
349. Shapiro, S.D. End-stage chronic obstructive pulmonary disease [Text] / S.D. Shapiro // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2001. – Vol. 164, № 3. – P. 339-340.
350. Slats, A. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap: asthmatic chronic obstructive pulmonary disease or chronic obstructive asthma? [Text] / A. Slats, C. Taube // *Ther Adv Respir Dis.* – 2016. – Vol. 10, № 1. – P. 57-71.
351. Soluble Adhesion Molecules E-Cadherin, Intercellular Adhesion Molecule-1 and E-Selectin as Lung Cancer Biomarkers [Text] / A. Gogali [et al.] // *Chest.* – 2010. – Vol. 138 – P. 1173-1179.
352. Soluble CD8 stabilizes the HLA class I molecule by promoting beta2M exchange: analysis in real-time [Text] / C.L. Morgan [et al.] // *Hum Immunol.* – 1999. – Vol. 60, № 5. – P. 442-449.
353. Soluble CD95 concentrations are increased in patients with severe systemic lupus erythematosus, but not in their first degree relatives [Text] / M.W. van der Linden [et al.] // *Ann Rheum Dis.* – 2001. – Vol. 60, №3. – P. 237-241.
354. Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction [Text] / F. Puppò [et al.] // *Scientific World Journal.* – 2002. – Vol. 2. – P. 421-423.

355. Soluble HLA class I/CD8 ligation triggers apoptosis in EBV CD8(+) cytotoxic T lymphocytes by Fas/Fas-ligand interaction [Text] / P. Contini [et al.] // Hum. Immunol. – 2000. – Vol. 61, № 12. – P. 1347-1351.

356. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation [Text] / P. Contini [et al.] // Eur J Immunol. – 2003. – Vol. 33, № 1. – P. 125-134.

357. Soluble HLA-I/peptide monomers mediate antigen-specific CD8 T cell activation through passive peptide exchange with cell-bound HLA-I molecules [Text] / M. Allard [et al.] // J Immunol. – 2014. – Vol. 192, № 11. – P. 5090-5097.

358. Spanish COPD Guidelines (GesEPOC): pharmacological treatment of stable COPD. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery [Text] / M. Miravittles [et al.] // Arch Bronconeumol. – 2012. – Vol. 48, №7. – P. 247-257.

359. Stoller, J.K. A review of α 1-antitrypsin deficiency [Text] / J.K. Stoller, L.S. Aboussouan // Am J Respir Crit Care Med. – 2012. – Vol. 185, №3. – P. 246-259.

360. Strain-specific immune response to Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / S. Sethi [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2004. – Vol. 169, № 4. – P. 448-453.

361. Surfactant protein-D regulates soluble CD14 through matrix metalloproteinase-12 [Text] / A.P. Senft [et al.] // J Immunol. – 2005. – Vol. 174, №8. – P. 4953-4959.

362. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / J.R. Hurst [et al.] // N Engl J Med. – 2010. – Vol. 363, № 12. – P. 1128-1138.

363. Systemic corticosteroids for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / J.A. Walters [et al.] // Cochrane Database Syst Rev. – 2014. – Rev. 9. – CD001288.

364. T cell activation state in the induced sputum of asthmatics treated with budesonide [Text] / A. Vatrella [et al.] // Int J Immunopathol Pharmacol. – 2010. – Vol. 23, № 3. – P. 745-753.

365. Tabayoyong, W.B. Soluble HLA revisited [Text] / W.B. Tabayoyong, N. Zavazava // Leuk Res. – 2007. – Vol. 31, № 2. – P. 121-125.

366. Tager, I. Role of infection in chronic bronchitis [Text] / I. Tager, F.E. Speizer // *N. Engl. J. Med.* – 1975. – Vol. 292. – P. 563–571.

367. Tashkin, D.P. Variations in FEV₁ decline over time in chronic obstructive pulmonary disease and its implications [Text] / D.P. Tashkin // *Curr Opin Pulm Med.* – 2013. – Vol. 9, № 2. – P. 116-124.

368. The acute influence of tobacco smoking on adhesion molecule expression on monocytes and neutrophils and on circulating adhesion molecule levels in vivo [Text] / D.A. Scott [et al.] // *Addiction Biology.* – 2000. – Vol. 5. – P. 195-205.

369. The effects of chronic bronchitis and chronic air-flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage [Text] / T.R. Martin [et al.] // *Am Rev Respir Dis.* – 1985. – Vol. 132, №2. – P. 254-260.

370. The effects of inhaled and oral corticosteroids on serum inflammatory biomarkers in COPD: an exploratory study [Text] / P. Man [et al.]. // *Therapeutic Advances in Respiratory Disease.* – 2009. – Vol. 3. – P. 73- 80.

371. The factor of infection in chronic bronchitis [Text] / C.H. Stuart-Harris [et al.] // *Q J Med.* – 1953. – Vol. 22, №86. – P. 121-132.

372. The Microbiome and the Respiratory Tract [Text] / R.P. Dickson [et al.] // *Annu Rev Physiol.* – 2016. – Vol. 78. – P. 481-504.

373. The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung [Text] / C.W. Wieland [et al.] // *J Immunol.* – 2005. – Vol. 175, №9. – P. 6042-6049.

374. The Natural History of Chronic Bronchitis and Emphysema [Text] / C. Fletcher [et al.]. – New York, USA : Oxford University Press, 1976.

375. The potential impact of anaemia of chronic disease in COPD [Text] / T. Similowski [et al.] // *Eur Respir J.* – 2006. - Vol. 27, № 2. – P. 390-396.

376. The role of nebulised budesonide in the treatment of exacerbations of COPD [Text] / H. Gunen [et al.] // *Eur Respir J* – 2007. – Vol. 29, № 4. – P. 660-667.

377. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14 [Text] / P.L. Dos Santos [et al.] // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2016. – Vol. 10, №1. – P. e0004375.

378. Tho, N.V. Asthma-COPD overlap syndrome (ACOS): A diagnostic challenge [Text] / N.V. Tho, H.Y. Park, Y. Nakano // *Respirology*. – 2016. – Vol. 21, № 3. – P. 410-418.

379. TLR2 signalling is critical for *Mycoplasma pneumoniae* induced airway mucin expression [Text] / H.W. Chu [et al.] // *J Immunol*. – 2005. – Vol. 174. – P. 5713–5719.

380. Toll-like receptor expression in smokers with and without COPD [Text] / I. von Scheele [et al.] // *Respir Med*. – 2011. – Vol. 105, № 8. – P. 1222-1230.

381. Treatment of patients with COPD and recurrent exacerbations: the role of infection and inflammation [Text] / S. Santos [et al.] // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. – 2016. – Vol. 11. – P. 515-525.

382. Two different dosages of nebulized steroid versus parenteral steroid in the management of COPD exacerbations: a randomized control trial [Text] / E. Yilmazel Ucar [et al.] // *Med Sci Monit* – 2014. – Vol. 20. – P. 513-520.

383. Up-regulation of ICAM-1mRNA and IL-1 β mRNA in lung tissues of a rat model of COPD [Text] / M. Ji [et al.] // *Int J Clin Exp Med*. – 2015. – Vol. 8, № 11. – P. 21956-21963.

384. Use of inhaled corticosteroids in COPD: improving efficacy [Text] / I.A. Yang [et al.] // *Expert Rev Respir Med*. – 2016. – Vol. 10, № 3. – P. 339-350.

385. Ventilatory Support in Chronic Respiratory Failure [Text] / eds.: N. Ambrosino, R.S. Goldstein. – New York : Informa. Pub, 2009. – 640 p.

386. Viral and bacterial infection in acute asthma and chronic obstructive pulmonary disease increases the risk of readmission [Text] / P.A. Wark [et al.] // *Respirology*. – 2013. – Vol. 18, № 6. – P. 996-1002.

387. Virus-induced exacerbations in asthma and COPD [Text] / D. Kurai [et al.] // *Front Microbiol*. – 2013. – Vol. 4. – P. 293.

388. Vitamin D deficiency causes deficits in lung function and alters lung structure [Text] / G.R. Zosky [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2011. – Vol. 183, № 10. – P. 1336-1343.

389. Vogelmeier, C.F. Systemic steroids in COPD-the beauty and the beast [Text] / C.F. Vogelmeier // *Respir Res.* – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. 38.

390. von Schéele, I. Interactions between alveolar epithelial cells and neutrophils under pro-inflammatory conditions [Text] / I. von Schéele, K. Larsson, L. Palmberg // *Eur Clin Respir J.* – 2014. – Vol. 1. – P. 24545.

391. Wedzicha, J.A. Roflumilast: a review of its use in the treatment of COPD [Text] / J.A. Wedzicha, P.M. Calverley, K.F. Rabe // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* – 2016. – Vol. 11. – P. 81-90.

392. Wenzel, S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches [Text] / S.E. Wenzel // *Nat Med.* – 2012. – Vol. 18, № 5. – P. 716-725.

393. Why is soluble intercellular adhesion molecule-1 related to cardiovascular mortality? [Text] / A. Becker [et al.] // *European Journal of Clinical Investigation.* – 2002. – Vol. 32. – P. 1-8.

394. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2010 [Text] / T. Vos [et al.] // *Lancet.* – 2012. – Vol. 380. – P. 2163-2196.

395. Zweigner, J. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response [Text] / J. Zweigner, R.R. Schumann, J.R. Weber // *Microbes Infect.* – 2006. – Vol. 8. – P. 946–952.