

На правах рукописи

Букреева Екатерина Борисовна

**ЭТИОЛОГИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА И
ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ
ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

14.00.43 – пульмонология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание
ученой степени доктора медицинских наук

Томск - 2004

Работа выполнена в ГОУВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России

Научный консультант: доктор медицинских наук,
профессор Волкова Людмила Ивановна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
профессор Зарипова Татьяна Николаевна

доктор медицинских наук,
профессор Черняк Борис Анатольевич
академик РАМН, доктор медицинских наук,
профессор Дыгай Александр Михайлович

Ведущая организация: ГОУВПО Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова Минздрава России

Защита состоится "21" октября 2004 года в _____ часов.

на заседании диссертационного совета Д 208.096.02 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан "___" _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Тюкалова Л.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – одна из важнейших проблем современного здравоохранения, причем это характерно для всего мира в связи с постоянно возрастающей распространенностью и смертностью от этого заболевания [Siafaras N.M. et al., 1995; Wilson R., Rayner C.F., 1995; Barnes P.J., 1997, 2003; Чучалин А.Г., 2000, 2001, 2003; Лещенко И.В., 2002; Go L.D., 2003]. По данным Всемирной организации здравоохранения, по наносимому экономическому ущербу ХОБЛ с 12-го места в 1990 году переместится на 5-е место к 2020 году, опередив все другие заболевания респираторной системы, в том числе и туберкулез легких [Anto J.M. et al., 2000; Чучалин А.Г., 2000; Шмелев Е.И., 2000, 2003].

В России приблизительно 11 млн. человек страдают ХОБЛ [Чучалин А.Г., 1998; ХОБЛ, Федеральная программа, 1999; Айсанов З.Р. и соавт., 2001; Овчаренко С.И., 2003] и, по прогнозам специалистов, в будущем будет отмечен неуклонный рост данной патологии как в развитых, так и в развивающихся странах [Anto J.M. et al., 2000; Овчаренко С.И., 2003; Шмелев Е.И., 2000, 2003].

ХОБЛ приводит к инвалидизации в среднем через 10 лет после установления диагноза и более чем в половине случаев это лица моложе 50 лет [Кокосов А.Н., 1999; Чучалин А.Г., 2002].

Драматизм и актуальность проблемы определяется не только широкой распространенностью ХОБЛ, но и высокой смертностью. В условиях ухудшающейся экологии при сохраняющемся темпе расширения табакокурения к 2020 году ХОБЛ, как причина смерти, выйдет на 3-е место во всем мире [Peto R. et al., 1992; Johansen J.M. 1994; American Thoracic Society Standarts, 1995; Murrey C.J., Lopez A.D., 1997; Авдеев С.Н., Чучалин А.Г., 1997; Zin B.Q. et al., 1998; Miller N. et al., 2000].

В настоящее время доказано, что воспаление играет доминирующую роль в патогенезе ХОБЛ, а основой прогрессирования является активизация хронического воспаления в дыхательных путях при обострении ХОБЛ, что в результате приводит к формированию основных морфологических проявлений болезни [Jerrey P.K., 1991; Bergman R. et al., 1994; Stockley R.A., 1996; Rennard S., 1997; Wilders P.I., Dekhuijzen P.N.R., 1997; Rhaman J.Mac Nec W., 1998; Чучалин А.Г., 1998, 1999, 2001; Peleman et al., 1999, Anto J.M. et al., 2000; Bhowmik A. et al., 2000; Garsia-Aumerick J. et al.; Stockley R.A., Bayley D.L., 2000; Voelker M.F., Tuder R., 2000; GO L.D., 2003].

Инфекции бронхимального дерева традиционно рассматриваются как ведущая причина обострения ХОБЛ [Bariffi F. et al., 1995; Crimi N. et al., 1995; Шмелев Е.И. и соавт., 1996; Calwerley P.N.A. et al., 1999, Бартлетт Д.Д., 2000; Международные рекомендации. Лечение обострений ХОБЛ, 2003; Авдеев С.Н., 2003].

Однако взгляды исследователей о вкладе инфекции в патогенез хронического воспаления при ХОБЛ колеблются в широком диапазоне: от мнения о том, что эта роль выдающаяся [Wilson R., 1994; Khair O.A. et al., 1996; Soler N. et al., 1999; Murphy T.F. et al., 1992, 2000; Woodhead M., Schaberg T., 2000; Бартлетт Д.Д., 2000; Sethi S., 2001; Grossman R.F., 2003], до утверждения, что инфекция – это только эпифеномен [Speizer F.E., Tager J.B., 1975; Tager J.B., Speizer F.E., 1979; Bent S. Et al., 1995; Fagon J.Y., Chaster, 1996; Bates D.V., 1998].

Примерно в 40-50% всех случаев причиной обострения ХОБЛ могут быть неинфекционные факторы [Wilson R., 1995; Martinez J., 1997; Синопальников А.И. и соавт., 1999; Дворецкий Л.И., 2001; Чучалин А.Г., 2002; Шмелев Е.И., 2002; Авдеев С.Н., 2003]. Бактериальные патогены выявляются у 50-60% больных с обострением ХОБЛ [Ball P., 1995; Dorca J., 1995; Faytard A. et al., 1995; Cole P., 1997; Leeper K.V. et al., 1997; Коваленко В.Л. и соавт., 1998; Eller J. et al., 1998; Huchon G., Woodhead M., 1998; Anzuetto A., 1999; Delamonica P., 1999; Donner C.F., 1999; Fein A. et al., 1999; Grossman R.F., 1999; Mirawilles M. et al., 1999; Niederman M.S., 1999; Wilson R., 1999; Zuck P. et al., 1999; Sethi S., 1999, 2000; Авдеев С.Н. и соавт., 2000; Sethi S., Murphy T.F., 2001; Barkli F. et al., 2002], тогда как роль атипичных микроорганизмов до настоящего времени неизвестна, так как практически отсутствуют комплексные исследования, направленные на выявление микоплазменной, хламидийной и бактериальной эндобронхиальной инфекции при обострении ХОБЛ.

Имеются сведения о том, что микроорганизмы поддерживают хроническое воспаление не столько непосредственно, сколько опосредованно через активацию основных клеток эффекторов: НФ, МФ, ЛФ, продуцирующих целый спектр биологически активных веществ: эластаза, МПО, ФНО α , ИЛ-8, α_2 -МГ и др. [Маянский Д.Н., 1991; Полосухин В.В., 1997; Коваленко и соавт., 1998; Hoffken G., 2000; Stockley R.A., 2000; Tobin Martin J., 2001].

Мы не встретили работ, где бы проводилось комплексное, системное изучение цито-биохимических и цитоморфологических маркеров воспаления при ХОБЛ в зависимости от наличия и характера инфекции, о влиянии инфекционного фактора на активность и выраженность воспаления у курящих и некурящих больных ХОБЛ.

Отсутствуют, либо имеются единичные сведения в отношении этиологии обострения ХОБЛ в зависимости от возраста, фактора курения [Raman A.S. et al., 1983; Riise G.S. et al., 1994], профессиональных вредностей, степени тяжести бронхиальной обструкции [Eller J. et al., 1998; Miravilles M. et al., 1999].

Для диагностики и оценки степени тяжести обострения ХОБЛ используются критерии обострения болезни, основанные на выраженности клинических симптомов [Anthonisen N. et al., 1987; Ball P., et al., 1995; Dorca J., 1995; Кокосов А.Н., 1999; Чучалин А.Г., 1998; Wilson R., 1999; Авдеев С.Н., 2003; Овчаренко С.И., Лещенко И.В., 2003], что предполагает существование взаимосвязей между клиническими проявлениями болезни и воспалением в дыхательных путях. Это положение пока не подтверждено научными данными, позволяющими ответить на вопрос: насколько клинические симптомы обострения ХОБЛ связаны с активностью воспалительного процесса в бронхах?

Учитывая, что не менее чем у трети больных обострение ХОБЛ имеет неинфекционный характер, важным представляется выявление наследственных факторов в формировании восприимчивости и резистентности к инфекционным агентам у больных ХОБЛ. В связи с этим перспективным может быть изучение одного из генов генома человека NRAMP1, который показывает ассоциации с рядом инфекционных заболеваний [Пузырев В.П. и др., 2002; Никитин Д.Ю., 2000].

Однако значение этого гена относительно восприимчивости к инфекционным агентам, а также функциональная значимость полиморфизмов этого гена при ХОБЛ не изучена.

Цель исследования: Определение цито-биохимических и цитоморфологических маркеров воспаления и их взаимосвязи с клинико-функциональными параметрами при обострении ХОБЛ в зависимости от наличия и характера инфекционного агента; оценка вклада полиморфных вариантов гена *NRAMP1* в предрасположенности к развитию обострений ХОБЛ инфекционного генеза.

Задачи исследования:

1. Изучить этиологию инфекционного процесса при обострении ХОБЛ в зависимости от возраста, фактора курения, профессиональных вредностей, степени тяжести бронхиальной обструкции.
2. Определить цито-биохимические маркеры воспаления в крови и мокроте при обострении ХОБЛ в зависимости от наличия и характера инфекционного агента.
3. Определить цитоморфологические маркеры воспаления при обострении ХОБЛ в зависимости от наличия и характера инфекционного агента.
4. Оценить влияние инфекционного фактора на активность и выраженность воспаления у курящих и некурящих больных ХОБЛ.
5. Изучить взаимосвязи между клиническими симптомами, показателями функции внешнего дыхания и биологическими маркерами воспаления при обострении ХОБЛ инфекционного и неинфекционного генеза.
6. Изучить уровень ИЛ-8 и ФНО- α в крови и мокроте в зависимости от наличия и характера инфекционного фактора.
7. Изучить активность воспалительного процесса при обострении ХОБЛ в зависимости от стадии болезни.
8. Провести анализ взаимосвязи полиморфных вариантов гена *NRAMP1* с обострением ХОБЛ инфекционного генеза.

Научная новизна:

Впервые изучена этиология инфекционного процесса при обострении ХОБЛ в данном регионе (г. Томск). Установлено, что наиболее частым этиологическим агентом является *S. pneumoniae*. Показана значительная роль в этиологии обострения внутриклеточных патогенов: *S. pneumoniae* и *M. pneumoniae*.

Впервые дана комплексная оценка воспалительного процесса по данным исследования активности МПО нейтрофилов, протеиназ, их ингибиторов, уровню цитокинов в крови и мокроте, а также по данным цитологического исследования ИМ и цитоморфологического исследования браш- и бронхобиоптатов при обострении и в фазу клинической ремиссии ХОБЛ.

Впервые дана характеристика воспаления у больных ХОБЛ при разной этиологии инфекционного процесса. Установлена большая выраженность воспалительной реакции и повреждения бронхиального эпителия при обострениях, ассоциированных с *H. influenzae* и *S. pneumoniae*. Показано, что меньшим

повреждающим действием на эпителий слизистой бронхов обладают *S. pneumoniae* и *M. catarrhalis*.

Впервые изучен цитокиновый профиль крови и мокроты в отношении уровней ФНО- α и ИЛ-8 при разной этиологии инфекционного процесса у больных ХОБЛ. Установлено, что наиболее высокий уровень ФНО- α в мокроте характерен для *H. influenzae*, а в периферической крови - для внутриклеточных патогенов.

Показано, что имеют место качественно разные типы структурных реакций бронхиального эпителия: при воспалительном процессе, ассоциированном с инфекцией, наблюдается высокий уровень пролиферативной активности эпителиоцитов с исходом в плоскоклеточную метаплазию, тогда как при воспалении неинфекционной этиологии – истощение регенераторных процессов с развитием атрофии в слизистой бронхов.

Впервые изучена выраженность воспалительного процесса при обострении ХОБЛ в зависимости от стадии болезни.

Впервые проведен анализ взаимосвязи полиморфных вариантов гена NRAMP1 с развитием ХОБЛ и клинико-функциональными проявлениями заболевания. Установлена роль гена NRAMP1 в формировании клинических особенностей течения болезни, а также его значимость в регуляции активности ингибиторов протеиназ.

Практическая значимость работы

Установлена значительная роль инфекционных агентов в этиологии обострения ХОБЛ. Показано, что инфекция является активным соучастником воспалительного процесса, как при обострении, так и в фазу клинической ремиссии ХОБЛ. Уже при II стадии ХОБЛ имеет место высокая активность воспаления, которая увеличивается при более тяжелых стадиях болезни, что подтверждает значение воспаления в прогрессировании ХОБЛ.

Полученные данные вносят вклад в понимание роли инфекции в патогенезе ХОБЛ и обосновывают необходимость проведения вакцинации против основных возбудителей инфекционного процесса (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*) и применения лекарственных препаратов, обладающих противовоспалительным эффектом уже при II стадии болезни (фенспирид).

Полученные результаты генетического исследования позволяют рекомендовать использование методов молекулярной диагностики для обследования населения с целью формирования групп риска по развитию ХОБЛ и для прогнозирования клинических особенностей течения заболевания. Сведения о влиянии аллельных вариантов гена NRAMP1 на уровень активности ингибиторов протеаз могут быть использованы в проведении прицельной терапии ХОБЛ, направленной на устранение дисбаланса в повреждающих и защитных системах.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Инфекция играет важную роль в этиологии обострения ХОБЛ. Наиболее частым этиологическим агентом является пневмококк. Значимая роль в этиологии обострения принадлежит внутриклеточным патогенам. Курение и профессиональные вредности влияют на этиологию обострения ХОБЛ.

2. Инфекция - не эпифеномен, а активный участник воспалительного процесса при обострении ХОБЛ. Большая выраженность воспаления имеет место при обострении ХОБЛ инфекционной этиологии. На характер и выраженность воспаления при обострении ХОБЛ влияют курение и активность α_1 ПИ в мокроте.
3. Имеют место особенности воспаления при инфекционной и неинфекционной этиологии обострения, а также у курящих и некурящих больных ХОБЛ.
4. Характер и выраженность воспаления зависят от вида конкретного возбудителя инфекционного процесса. Наибольшая выраженность воспаления и большая степень повреждения бронхиального эпителия характерны для обострений ХОБЛ, вызванных *H. influenzae* и *S. pneumoniae*. Наименьшим повреждающим эффектом обладают *S. pneumoniae* и *M. catarrhalis*, последняя - в большей степени.
5. В фазу клинической ремиссии ХОБЛ сохраняется активный воспалительный процесс в бронхах. Микроорганизмы, колонизирующие нижний респираторный тракт, влияют на выраженность воспаления и в фазу клинической ремиссии ХОБЛ.
6. Только при I стадии ХОБЛ обострение характеризуется меньшей выраженностью воспаления в бронхах. Уже, начиная со II стадии болезни, имеет место высокая активность воспалительного процесса, выраженность которого остается высокой и даже увеличивается при прогрессировании болезни. Обострение ХОБЛ приводит к выраженному повреждению и структурной перестройке бронхиального эпителия.
7. Сроки манифестации хронической обструктивной болезни легких ассоциируются с 1465-85G/A полиморфизмом гена *NRAMP1*, в то время как степень выраженности бронхообструкции связана с D543N полиморфизмом этого гена. Активность ингибиторов протеаз связана с полиморфизмами D543N и 469+14G/C гена *NRAMP1*.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются в работе пульмонологического отделения МКЛПМУ «Городская больница №3» и других лечебных учреждений г. Томска. Данные диссертационной работы используются в учебном процессе при преподавании внутренних болезней на педиатрическом факультете СибГМУ и в Томском военно-медицинском институте.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на Областной пульмонологической конференции по хронической обструктивной болезни легких (2003, Россия, г. Томск), на Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (2003, Россия, г. Санкт-Петербург), на Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (2004, Россия, г. Москва), Европейском респираторном конгрессе (2004, Шотландия, г. Глазго), Международном конгрессе по биотехнологиям (2004, США, г.

Майами), представлены на Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (2001, 2002, Россия, г. Москва), Российской конференции «Современные проблемы антимикробной химиотерапии» (2002, 2003, Россия, г. Москва), Европейском респираторном конгрессе (2002, Швеция, г. Стокгольм), Европейском респираторном конгрессе (2003, Австрия, г. Вена), Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным болезням (2003, Великобритания, г. Глазго), Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным болезням (2004, Чехословакия, г. Прага), Европейском конгрессе по генетике человека (2003, Великобритания, г. Бирмингем).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 60 научных работ, из них 15 в центральной и 18 – в зарубежной печати. Получены два патента на изобретение.

Работа выполнялась: на кафедре внутренних болезней педиатрического факультета (заведующая – профессор Л.И.Волкова), кафедре биохимии и молекулярной биологии (заведующий – профессор В.Ю.Серебров), кафедре патологической анатомии (заведующий – профессор В.М.Перельмутер), кафедре медицинской генетики (заведующий – академик РАМН, профессор В.П.Пузырев), центральной научно-исследовательской лаборатории (заведующий – профессор А.Н.Байков) Сибирского государственного медицинского университета (ректор – член-корр. РАМН, профессор В.В.Новицкий).

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 394 страницах машинописного текста, иллюстрирована 70 таблицами и 85 рисунками и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 5 глав, отражающих собственные результаты, обсуждение полученных результатов и выводы. Список использованной литературы содержит 584 наименования, из них: 152 отечественных и 432 иностранных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект исследования

Исследование проводилось в 2 этапа. Первый этап – скрининговый отбор больных с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ). Диагноз основывался на данных анамнеза, клинической картине заболевания (кашель, продукция мокроты, экспираторная одышка, высокотональные сухие хрипы, особенно при форсированном выдохе в клиностатическом положении пациента; клинические признаки эмфиземы), показателях функции внешнего дыхания (ОФВ₁, ОФВ₁/ФЖЕЛ). На первом этапе преимущественно амбулаторно или в стационаре было осмотрено 529 пациентов, из которых у 119 была диагностирована ХОБЛ.

На втором этапе проводилось обследование 103 больных ХОБЛ, из них 29 женщин и 74 мужчин в возрасте от 26 до 80 лет, средний возраст $51,9 \pm 14,1$ года. Длительность заболевания от 5 до 57 лет, средняя длительность заболевания составила $16,5 \pm 10,3$ года, среднее значение ОФВ₁ – $58,0 \pm 19,8\%$ к должным величинам.

Количество некурящих больных – 33 (32,0%), курящих – 70 (68,0%). Средний индекс курения составил $58,9 \pm 37,5$ пачек/лет. Профессиональные вредности в анамнезе (переохлаждение, воздействие высоких температур, химические раздражители, газы, пыль) имели место у 81 (79,6%) пациента. У 80 (77,6%) пациентов имелись клинические и рентгенологические признаки эмфиземы легких.

Все больные находились на стационарном лечении в пульмонологическом отделении городской больницы №3 в период с января 1999 по декабрь 2002 года.

Основанием для включения в исследование было:

- наличие у больного хронического бронхита (ежедневный кашель с мокротой в течение трех или более месяцев в году на протяжении двух или более лет);
- наличие у больного бронхиальной обструкции, при которой обратимость обструкции не превышала 15%;
- отсутствие в анамнезе приступов удушья, астении;
- отсутствие других заболеваний, сопровождающихся кашлем и одышкой.

Обязательным было получение у каждого больного информированного согласия.

В исследование не включались:

- больные, получавшие терапию глюкокортикостероидами (пероральные или ингаляционные) и нестероидными противовоспалительными препаратами на момент включения в исследование;
- больные с тяжелыми сопутствующими заболеваниями;
- больные с острыми или обострением хронических сопутствующих заболеваний.

Больные с ХОБЛ были обследованы в период обострения болезни, который характеризовался усилением кашля, одышки; увеличением количества отделяемой мокроты, сухих хрипов в легких; увеличением количества лейкоцитов в крови.

По типам обострения ХОБЛ согласно классификации N.R. Anthonisen (1987) больные распределялись следующим образом: I тип имел место у 48 (46,6%) больных, когда имелись все 3 основных симптома, такие как усиление одышки, увеличение объема мокроты, появление гнойной мокроты; II тип – у 44 (42,7%) больных, когда имелись 2 из 3 основных симптомов и III тип – у 11 (10,7%) больных, у которых имелся только 1 из основных симптомов и какой-либо дополнительный симптом (лихорадка, усиление кашля, увеличение количества хрипов в легких). Степень тяжести ХОБЛ определялась согласно GOLD, WHO, 2003 год, данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика больных ХОБЛ по степени тяжести (n=103)

Стадия ХОБЛ	Количество больных		ОФВ ₁ * (X±m)
	Абсолютное количество	%	
I стадия, легкое течение	35	33,6	83,9±3,0
II стадия, среднетяжелое течение	40	38,7	67,1±7,8
III стадия, тяжелое течение	20	19,3	39,5±5,4
IV стадия, крайне тяжелое течение	8	8,4	22,6±4,6

* - В % к должным величинам

Исследование функции внешнего дыхания проводилось путем анализа кривой «поток - объем» и показателей спирометрии с использованием программного обеспечения Spiro Vision II Spirometry System, USA. Вычислялись должные показатели, из которых анализировались: форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ₁), отношение ОФВ₁/ФЖЕЛ (Индекс Тиффно), форсированный средне-эспираторный поток (МОС 25-75), форсированные эспираторные потоки на различных уровнях ЖЕЛ (МОС 25, МОС 50, МОС 75). Всем больным проводилась проба с бронхолитиками. Для этого применялись сальбутамол либо атронт [Калманова Е. Н., Айсанов З. Р., 2000].

Из 103 больных ХОБЛ 67 пациентов наблюдались и обследовались в динамике. Все исследования проводились в период обострения до начала лечения и через 3 месяца терапии (ипратропиум бромид, теофиллины, симпатомиметики, антибактериальная терапия по показаниям, глюкокортикостероиды коротким курсом при ОФВ₁ < 50% от должного, эреспал). Весь период исследования пациенты ежедневно вели дневник индивидуального наблюдения, в котором по визуальным шкалам оценивали выраженность кашля, одышки, количество мокроты. У 53 больных (79%) к концу третьего месяца наблюдения зарегистрирована клиническая ремиссия, которая характеризовалась уменьшением интенсивности кашля, количества мокроты, уменьшением выраженности одышки и исчезновением, либо значительным уменьшением количества сухих хрипов. У 14 больных (21%) отсутствовал положительный эффект от лечения, выраженность клинико-лабораторных показателей оставалась на прежнем уровне, либо менялась

незначительно. Все 14 больных с отсутствием эффекта имели тяжелое (III стадия), либо крайне тяжелое (IV стадия) течение ХОБЛ [GO L.D., 2003].

Контрольную группу составили 110 волонтеров, не страдающих бронхолегочной патологией. Условиями для включения в контрольную группу были: отсутствие кашлевого анамнеза; патологических изменений при обзорной рентгенографии легких; нормальные показатели функции внешнего дыхания по данным спирографии; в течение предшествующих 3-х месяцев не было острых респираторных заболеваний.

Методы исследования

Микробиологическое исследование мокроты проводилось в строгом соответствии с положениями, изложенными в «Основных методах лабораторных исследований в клинической микробиологии», ВОЗ, 1994 г.

Исследованию подлежала выделяющаяся при кашле утренняя мокрота, которую больные собирали в стерильную баночку. Перед откашливанием больные чистили зубы и несколько раз прополаскивали полость рта и зев стерильным физиологическим раствором с целью механического удаления слущенного эпителия и микрофлоры ротовой полости. При отсутствии у больного спонтанно отделяемой мокроты, либо скудном ее количестве исследовалась ИМ, забор которой проводился после ингаляции 3-5% раствора NaCl через небулайзер в течение 3-10 мин. Из мокроты готовили мазки и окрашивали по Граму. При наличии в мазке более 25 лейкоцитов и менее 10 эпителиальных клеток в поле зрения (увеличение $\times 100$) проба подлежала микробиологическому исследованию.

Выявление в мазке значительного количества грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов с типичной морфологией служило ориентиром для дальнейшего культурального исследования. Культивирование производилось количественным методом, который обеспечивает выделение чистых культур микроорганизмов и дает возможность судить более точно об этиологической значимости выделенных бактерий. Микроб, обнаруженный в концентрации 10^6 и выше в 1 мл мокроты, считается ответственным за возникновение воспалительного процесса [Bartlett J. G. , 1987]. Выделение и идентификация микроорганизмов проводилась посредством изучения их морфологических, культуральных, биохимических признаков. С кровяного агара отбирали колонии по морфологии сходные с пневмококком, с шоколадного – с гемофильной палочкой, с эндо – с представителями энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий, с желточно-солевого – со стафилококком. Проводили их точную идентификацию и определяли чувствительность к антибактериальным препаратам в соответствии с NCCLS стандартами.

Для определения фрагментов генома *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в мокроте методом полимеразной цепной реакции использовались стандартные наборы научно-производственной фирмы Литех и научно-производственного объединения ДНК-технология в соответствии с рекомендациями производителей.

Титры IgM и IgG к *Chlamydia pneumoniae* определялись иммуноферментной тест-системой «Хлами Бест» ЗАО «Вектор-Бест», а к *Mycoplasma pneumoniae* –

иммуноферментной тест-системой «Trinity biotex» США согласно рекомендациям производителя.

Для определения уровней ИЛ-8 и ФНО- α в сыворотке крови и мокроте использовали твердофазный иммуноферментный анализ на основе стандартного набора реагентов ProCon TNF- α ООО «Протеиновый контур» и тест-системы для определения ИЛ-8 ООО «Цитокин» в соответствии с рекомендациями производителя.

Индуцированную мокроту получали у здоровых и больных после ингаляции 3 - 5% раствора NaCl через небулайзер. Мокрота подвергалась лабораторной обработке не позднее чем через 2 часа после ее получения. Из полученного осадка готовились мазки в количестве 3-4 от одного больного. Проводился дифференцированный подсчет 400 клеток, среди которых учитывались ЭФ, НФ, МФ и ЛФ. Полученные результаты выражались как в абсолютных цифрах (количество клеток $\times 10^6$ в мл), так и в процентах [Авдеев С.Н., 1998; Kips J., 1998, 2000; Jayaram L., 2000].

Активность МПО нейтрофилов в мазках крови и мокроты определялась цитохимическим методом. Принцип метода основан на окислении бензидина системой перекись водорода - пероксидаза. В цитоплазме клеток, дающих положительную реакцию на пероксидазу, видны гранулы от желто-зеленого до коричневого цвета.

Результаты оценивали полуколичественным методом с использованием принципа Astaldi, основанном на выявлении различной степени интенсивности специфической окраски [Astaldi G., Verga L., 1957]. Для количественного выражения результатов подсчитывали 100 сегментоядерных НФ, которые в зависимости от выраженности специфической окраски делили на 4 группы (рис. 1,2):

Группа 0 - отрицательная реакция, отсутствие окраски;

Группа 1 - слабopоложительная реакция, гомогенное окрашивание цитоплазмы или мелкие множественные пылевидные гранулы, закрывающие не всю цитоплазму;

Группа 2 - положительная реакция, окраска выявляется в форме ярких, четко очерченных гранул, которые полностью заполняют цитоплазму;

Группа 3 - резкоположительная реакция, крупные гранулы, которые полностью заполняют цитоплазму и покрывают ядро.

Рассчитывали средний цитохимический коэффициент по формуле: $СЦК = (0a + 1b + 2в + 3г) / 100$, где: 0, 1, 2, 3 – номер группы; а, б, в, г – число клеток в каждой группе [Karlow L., 1957].

Активность эластазы, трипсиноподобных протеиназ определяли в плазме крови и мокроте, спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза *n*-нитрофенилового эфира-*N*-бутил-оксикарбонил-*L*,*D*- аланина (БАНЭ) и *N*-бензоил-*L*-аргинин этилового эфира (БАЭЭ) [Оглоблина О.Г. и соавт., 1981, 1984]. Активность α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина и кислотостабильных ингибиторов также

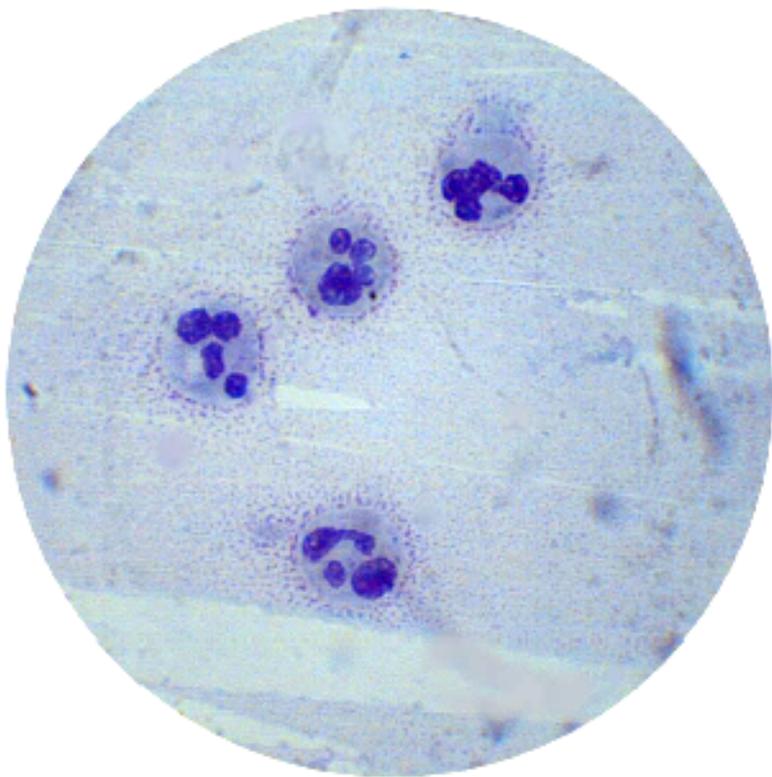


Рис. 1. Мазок мокроты. Группа нейтрофилов с отрицательной реакцией на миелопероксидазу. Окраска по Грэхему-Кноллю. Увеличение x1500. Иммерсия

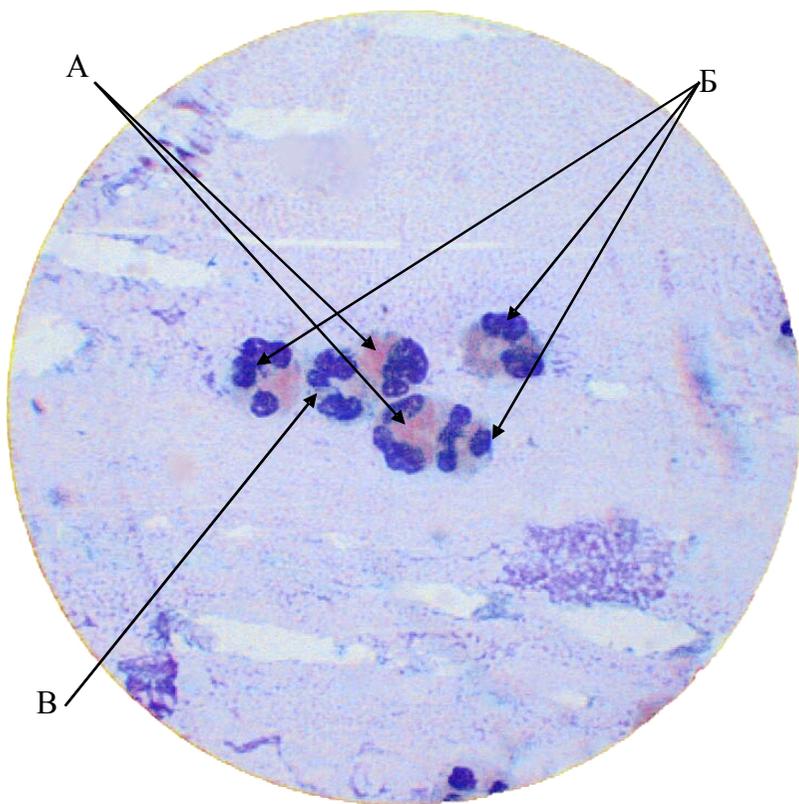


Рис. 2. Мазок мокроты. Группы нейтрофилов. Реакция на миелопероксидазу: А – резко выраженная, Б – выраженная, В – слабоположительная. Окраска по Грэхему – Кноллю. Увеличение x1500 Иммерсия

определяли в плазме крови и мокроте спектрофотометрически по торможению скорости гидролиза БАЭЭ трипсином [Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С., 1979, Оглоблина О.Г., 1984].

Забор материала для браш-и бронхобиопсии проводился во время бронхофиброскопии (БФС), которая проводилась больным с их добровольного согласия и с соблюдением всех необходимых условий. Исследование проводилось натощак, в утренние часы, в условиях бронхологического кабинета. Для БФС использовался фибробронхоскоп BF-P20D (Olympus, Япония). Бронхиальная браш-биопсия осуществлялась при помощи стерильной нейлоновой щеточки. Проводилось 3-5 последовательных движений в области намеченной зоны бронхиальной стенки [Riise G., 1996, 2000]. Из полученного при браш-биопсии соскоба слизистой, готовили цитологические препараты путем нанесения материала на предметное стекло в виде тонкого мазка (в количестве 3-4 от каждого больного). Препараты фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Для цитологического исследования окрашенных препаратов применяли светооптический бинокулярный микроскоп «Биолам Ломо». Просмотр проводили под иммерсией. Для оценки поверхностных слоев эпителия бронхов подсчитывались 500 клеток бронхиального эпителия, среди которых выделяли: реснитчатые клетки (нормального строения, с признаками атрофии, дистрофии, пролиферации), бокаловидные, резервные и метаплазированные плоскоэпителиальные клетки. В тяжах пристеночной слизи определяли 100 клеток неэпителиального происхождения, условно названных клетками сопровождения, куда входили МФ, ЛФ, ЭФ, НФ и плазмциты. В дальнейшем каждая из цитограмм (бронхиального эпителия и клеток сопровождения) оценивалась по отдельности и выражалась в процентах.

Эндобронхиальную биопсию проводили после завершения браш-биопсии. Фрагменты слизистой оболочки отделяли с помощью специальных бронхоскопических щипцов [Исмаилов Ш.Ш., 2000]. Для гистологического исследования фрагменты ткани бронха фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Далее материал обезвоживали в спиртах восходящей крепости, обезжировали и заливали в парафин [Меркулов Г.А., 1969]. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. При световой микроскопии проводили качественную оценку патологических изменений в слизистой бронхов, пролиферацию резервных клеток, десквамацию покровного эпителия, наличие бокаловидно- и базальноклеточной гиперплазии, а также плоскоклеточной метаплазии. Степень выраженности плоскоклеточной метаплазии, базальноклеточной и бокаловидноклеточной гиперплазии оценивали в баллах. В препаратах определяли поля зрения с максимально выраженным признаком, в которых при увеличении объектива микроскопа $\times 40$ (0,17 мм²) производили подсчет количества клеток с последующим пересчетом на 1 мм² слизистой: МЭЛФ, МЭЭФ, НФ и ЭФ среди клеток инфильтрата стромы слизистой.

С целью исключения из дальнейшего исследования больных с тяжелой врожденной α 1-антитрипсиновой недостаточностью, которая также приводит к развитию ХОБЛ, но, являясь моногенным заболеванием, требует совершенно иного подхода к диагностике и лечению, было проведено генотипирование двух наиболее распространенных мутантных аллелей гена Pi (S и Z) в группах больных ХОБЛ. В результате исследования было выявлено 2 MS гетерозиготных носителя, SS и ZZ генотипы выявлены не были, что позволило оставить выборки больных без

изменений, поскольку при данном генотипе (MS) количество синтезируемого $\alpha 1$ -ПИ достаточно для защиты легочной ткани от воздействия эндогенных эластаз [AATD, 1997].

Исследованы 3 полиморфных варианта гена макрофагального протеина 1, ассоциированного с естественной резистентностью (*NRAMP1*). Характеристика исследованных полиморфизмов представлена в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика исследуемых полиморфизмов

Полиморфизм (локализация)	Праймеры*	Рест- рик- таза	Продукты гидролиза, п. о.		Источник
			Аллель «дикого» типа	Мутантный аллель	
469+14 G/C (Интрон 4)	F- CTCTGGC TGAAGGC TCTCC R- TGTGCTAT CAGTTGA GCCTC	Apa I	624	425 и 169	Yang Y.S. et al., 2000
D543N (Экзон 15)	F- GCATCTC CCCAATT CACGGT R- AACTGTC CCACTCTA TCCTG	Bme18I	240 и 39	126, 79 и 39	Yang Y.S. et al., 2000
1465-85 G/A (Интрон 13)	F- GCAAGTT GAGGAGC CAAGAC R- ACCTGCA TCAACTC CTCTTC	Bse12I	142, 75 и 24	102, 75, 40 и 24	Yang Y.S. et al., 2000

* - Температура отжига праймеров 60°C

ДНК выделяли по стандартной неэнзиматической методике из лимфоцитов периферической крови, взятой из кубитальной вены [Маниатис Т. и соавт., 1984; Lahiri D.K. et al., 1992]. Выделенную ДНК замораживали и хранили при -20°C до проведения генотипирования.

Изучение полиморфных вариантов исследуемых генов проводили с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в геномной базе данных (GDB) и литературе (табл. 2).

Полученные данные подвергались статистической обработке при помощи программы STATISTICA 6.0 for Windows. Количественные показатели представлены в виде ($\bar{X} \pm Sx$). Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывалось абсолютное число и относительная величина (%). При проверке совпадения распределения исследуемых количественных показателей с нормальными в группах пользовались критерием согласия Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий в случае, если закон распределения исследуемых числовых показателей отличался от нормального, проверяли при помощи U-критерия Манна – Уитни, H-критерия Краскала-Уоллиса и точного теста Фишера (для качественных признаков). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для определения существования функциональных связей между параметрами вычисляли коэффициент корреляции R Спирмана, который считали достоверным при $p < 0,05$. Анализ факторов, определяющих особенности и выраженность воспаления при различной его этиологии, проводили с использованием метода главных компонент [Лакин Г. Ф., 1980.]

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга (PXB) с помощью точного теста Фишера [Вейр, 1995].

Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность.

Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом рассчитывали показатель отношение шансов (OR) по формуле: $OR = ad/bc$, где a - частота анализируемого аллеля у больных; b - частота анализируемого аллеля в контрольной выборке; c и d- суммарная частота остальных аллелей у больных и в контроле соответственно [Allison, 1997]. Величина $OR = 1$ указывает на отсутствие ассоциации, $OR > 1$ – имеет место при положительной ассоциации ("фактор риска") и $OR < 1$ – отрицательная ассоциация аллеля с заболеванием. Обсуждение величин OR проводили при уровне значимости не более 5%.

Для оценки связи качественных признаков с исследуемыми генетическими маркерами использовали критерии χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность при числе степеней свободы равном 1 и точный тест Фишера при ожидаемом числе наблюдений хотя бы в одной из ячеек таблицы сопряженности менее 5.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инфекционный процесс занимает особое место в патогенезе воспаления при ХОБЛ [Чучалин А.Г., 1998; Wilson R., 1999; Шмелев Е.И., 2003; Sethi S., Murphy T.F., 2001]. Действие инфекционных агентов многогранно, и условно можно выделить

два основных его компонента: провоспалительный и повреждающий [Чучалин А.Г., 1998]. Вместе с тем обострение ХОБЛ не является синонимом внутрилегочной инфекции [Murphy T.F., Sethi S., 1992] и антибактериальная терапия не уменьшает числа рецидивов [Riise G.S., 1997].

Настоящее исследование явилось попыткой оценить роль инфекции в патогенезе воспаления при обострении и в фазу клинической ремиссии ХОБЛ, поскольку есть данные о персистирующем воспалении и в эту фазу болезни [Wilson R., 1999]. Изучено провоспалительное и повреждающее действие инфекционного фактора как такового и отдельных инфекционных агентов при обострении ХОБЛ. Провоспалительное действие изучалось по активности протеиназ, ингибиторов, МПО нейтрофилов, уровню цитокинов в крови и мокроте, а также по цитологическому составу ИМ и бреш-биоптатов (клеток воспаления). Повреждающий компонент оценивали по характеру и выраженности структурной перестройки эпителиоцитов слизистой бронхов по данным цитоморфологической картины бреш- и бронхобиоптатов.

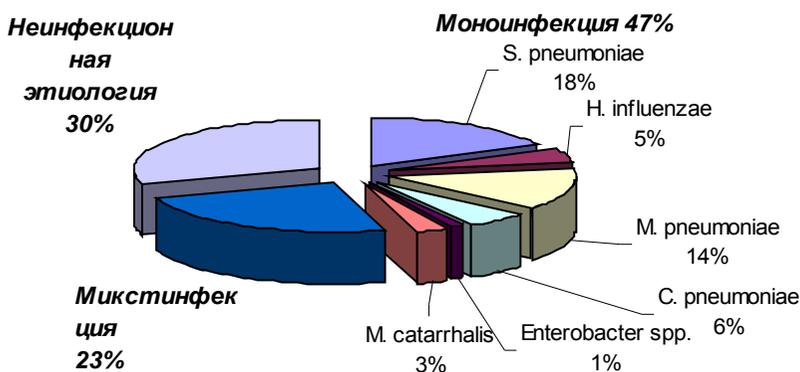


Рис. 3. Этиологическая структура обострений ХОБЛ

Исходя из цели работы, основные группы сравнения формировались по альтернативному признаку – наличие или отсутствие инфекционного фактора, а также в зависимости от вида конкретного инфекционного агента в качестве причины обострения ХОБЛ. В соответствии с этим проведено изучение этиологической структуры инфекционного процесса у 103 больных с обострением ХОБЛ (рис. 3).

Установлено, что в 70% случаев обострение ХОБЛ имеет инфекционную этиологию, причем наиболее значимым инфекционным агентом оказался пневмококк (41,7%), тогда как обострение ХОБЛ, ассоциированное с гемофильной палочкой (14,6%) и внутриклеточными патогенами (*M. pneumoniae* – 14,6%, *C. pneumoniae* – 16,5%), встречалось реже и приблизительно с одинаковой частотой. *M. catarrhalis* в качестве причины обострения имела место только у 12,6% больных ХОБЛ, при этом почти всегда в ассоциации с пневмококком. Обращает внимание, что во всех случаях обострения ХОБЛ, вызванного микстинфекцией (23%), обязательно присутствовал пневмококк (рис.4).

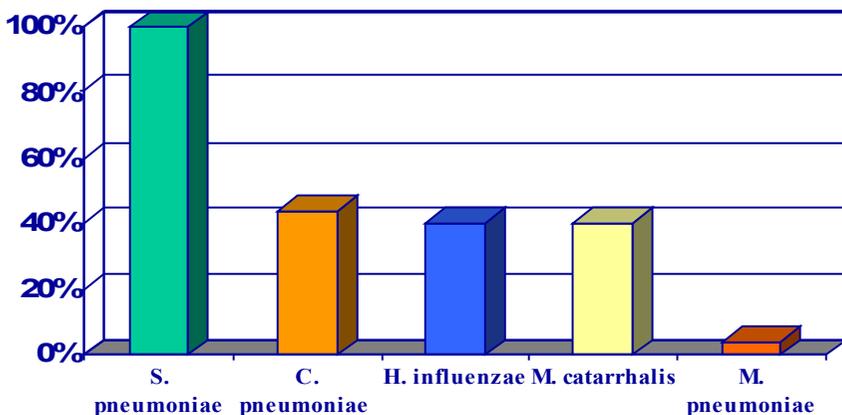


Рис. 4. Этиологический фактор обострений ХОБЛ, ассоциированных с микст-инфекцией

Полученные нами данные о доминирующей роли пневмококка в этиологии обострения у больных ХОБЛ не совпадают с результатами исследования ряда иностранных авторов, большинство из которых отдает пальму первенства гемофильной палочке [Aldons P.A. et al., 1990; Basran G.S. et al., 1990; Ball P. et al., 1994; Anzueto A. et al., 1997; Grossman R.F. et al., 1998, 1999; Fein A. et al., 1999; Leanord A. et al., 2002; Mygind L.H. et al., 2002], однако подтверждают мнение Л.А.Вишняковой (1993) и В.Л. Коваленко и соавт. (1998) о том, что в основе патогенеза ХОБЛ лежит хроническая пневмококковая инфекция, поражающая различные отделы бронхиального дерева и для которой характерна постоянная персистенция пневмококков, несмотря на антибактериальную терапию. Высокий процент пневмококковой инфекции у обследованных нами больных может быть обусловлен особенностями этиологической структуры инфекционного процесса у больных ХОБЛ в данном регионе (г. Томск).

В последние годы возрос интерес к роли внутриклеточных патогенов при обострении ХОБЛ [Чучалин А.Г., 1999; Fagon J.V. et al., 1990; Blasi F. et al., 1993; Dorsa J., 1995; Gendral D., 1996; Sethi S., 2000]. Вместе с тем имеются лишь единичные работы, в которых наряду с бактериями изучалась бы роль внутриклеточных патогенов, чаще одного: *M. pneumoniae* либо *C. pneumoniae* при обострении ХОБЛ [Hoepelman J.M. et al., 1997; Vernejoux J.M. et al., 1997; Leophonte P. et al., 1998]. В большинстве работ использовались только серологические методы исследования, возможно, поэтому данные в отношении участия внутриклеточных патогенов в обострении ХОБЛ весьма противоречивы: от полного отрицания [Vernejoux J.M. et al., 1997; Goh S. et al., 1998] до признания их роли в этиологии обострения у 5-70% больных ХОБЛ [Beaty C. et al., 1991; Cook P.J., Honeybourne D., 1995; Mijashita N. et al., 1998; Huchon J., Woodhead M, 1998, Santus P. et al., 2002]. Наиболее обстоятельно частота инфекции *C. pneumoniae* при ХОБЛ изучена L. von Hertzen и соавт. (1997): в данной работе использовано сочетание серологических

методов (определение антител в *S. pneumoniae* в крови и мокроте) и полимеразной цепной реакции к ДНК *S. pneumoniae* в мокроте. По данным авторов, частота хламидийной инфекции имела место у 71% больных с тяжелой формой ХОБЛ, у 46% - с менее тяжелыми стадиями болезни и отсутствовала в контрольной группе здоровых лиц.

По нашим данным, приблизительно у 30% больных обострение ХОБЛ ассоциировано с внутриклеточными патогенами, при этом *M. pneumoniae* встречалась достоверно чаще в виде моноинфекции, тогда как *S. pneumoniae* в сочетании с *H. influenzae*, либо *S. pneumoniae*, что совпадает с данными, которые приводит в своем обзоре M.R. Hammerschlag (2000). Вместе с тем, возможно, имеет место сочетание микоплазменной инфекции с вирусной, роль которой в данной работе не исследовалась. Так, по данным Н.В. Яковлевой (2002), у 84,2% обследованных больных из всех, у кого была выявлена вирусная инфекция, зарегистрированы вирусно-микоплазменные ассоциации, что может быть обусловлено общими механизмами развития инфекционного процесса, так как те и другие микроорганизмы объединяет отсутствие клеточной оболочки.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают значение инфекционного фактора в этиологии обострения ХОБЛ. Далее перед нами стояла задача изучить влияние инфекции на характер и выраженность воспаления при обострении и в фазу клинической ремиссии болезни. Многие авторы считают инфекцию эпифеноменом болезни, а не активным участником воспалительного процесса при обострении ХОБЛ [Tager J.B., Speizer F.E., 1975; Speizer F.E., Tager J.B., 1979; Bent C. et al., 1995; Fagon J.Y., Chaster N., 1996; Bates D.V., 1998; Smith J.A. et al., 1999], и аргументируют свою точку зрения тем, что при стабильном течении ХОБЛ часто выделяются те же микроорганизмы как из мокроты, так и из лаважной жидкости, что и в фазу обострения. Для ответа на этот вопрос мы, прежде всего, определили значимость использованных в работе цито-биохимических показателей для оценки выраженности воспалительного процесса у больных ХОБЛ. Оказалось, что наиболее достоверно отражают активность воспаления бронхов при обострении ХОБЛ цито-биохимические показатели мокроты: МПО нейтрофилов, эластаза, ТПП, α_1 -ПИ, α_2 -МГ и КСИ, активность которых оказалась существенно и достоверно выше (за исключением КСИ) как по сравнению с контрольной группой (здоровые лица), так и с группой больных ХОБЛ, находящихся в фазе клинической ремиссии (табл. 3, 4).

Поскольку местно синтезируемые КСИ отражают состояние местных защитных механизмов [Оглоблина О.Г., 1980; Коваленко В.Л. и др., 1998], то наиболее вероятно, что достоверное снижение их активности в мокроте у больных ХОБЛ независимо от фазы болезни по сравнению с группой здоровых отражает истощение местных защитных механизмов при хроническом воспалении в бронхах. С учетом полученных результатов в дальнейшем основной акцент был сделан на цито-биохимические показатели мокроты.

Сравнительный анализ между группами больных с инфекционной и неинфекционной этиологией обострения ХОБЛ (табл. 5, 6) выявил большую выраженность воспалительного процесса при обострении, ассоциированном с

Таблица 3

Показатели активности протеиназ и их ингибиторов в мокроте здоровых и больных ХОБЛ при обострении и в фазу клинической ремиссии ($\bar{X} \pm S_x$)

Показатели	Здоровые, (n=22)	Больные ХОБЛ, обострение, (n=103)	Больные ХОБЛ, ремиссия, (n=53)	P
	1	2	3	
$\alpha 1$ -ПИ, ИЕ/мл	0,2±0,1	0,5±0,2	0,2±0,1	P ₁₋₂ = 0,005 P ₁₋₃ =0,85 P ₂₋₃ = 0,008
$\alpha 2$ – МГ, ИЕ/мл	0,02±0,0	0,2±0,05	0,02±0,0	P ₁₋₂ = 0,033 P ₁₋₃ =0,88 P ₂₋₃ = 0,035
КСИ, мИЕ/мл	11,4±7,7	5,7±3,2	4,2±1,8	P ₁₋₂ = 0,001 P ₁₋₃ = 0,036 P ₂₋₃ =0,59
ТПА, нмоль/мин мл	0,5±0,2	4,1±2,4	1,0±0,5	P ₁₋₂ = 0,002 P ₁₋₃ = 0,047 P ₂₋₃ = 0,001
Эластаза, нмоль/мин мл	0,2±0,1	0,9±0,1	0,5±0,3	P ₁₋₂ = 0,000 P ₁₋₃ = 0,035 P ₂₋₃ = 0,042

Таблица 4

Активность миелопероксидазы нейтрофилов в мокроте больных ХОБЛ при обострении и в фазу клинической ремиссии ($\bar{X} \pm S_x$) %

Показатели	Больные ХОБЛ, обострение (n = 103)	Больные ХОБЛ, ремиссия (n = 53)	p

Распределение нейтрофилов по подгруппам в зависимости от степени выраженности реакции на МПО	Отрицательная	3,0±0,4	1,6±0,4	<i>0,025</i>
	Слабоположительная	13,4±6,2	9,5±4,1	<i>0,038</i>
	Выраженная	54,9±8,5	58,2±5,1	<i>0,66</i>
	Резко выраженная	28,7±8,9	30,7±4,3	<i>0,31</i>
СЦК	2,2±0,5	2,0±0,5	<i>0,36</i>	

инфекцией, что подтверждает данные S. Sethi и соавт. (2000) о большей активности воспалительного процесса при «патоген-положительном» обострении болезни (то есть при обострении, вызванном микроорганизмами).

Таблица 5

Показатели активности протеиназ и их ингибиторов в мокроте здоровых и больных ХОБЛ при инфекционной и неинфекционной этиологии обострения ($\bar{X} \pm Sx$)

Показатели	Здоровые (n=22)	Больные ХОБЛ, инфекционное обострение (n=72)	Больные ХОБЛ, неинфекционн ое обострение (n=31)	P
	1	2	3	
α 1-ПИ (ИЕ/мл)	0,2±0,1	0,6±0,3	0,3±0,2	P ₁₋₂ = 0,014 P ₁₋₃ =0,73 P ₂₋₃ = 0,017
α 2-МГ (ИЕ/мл)	0,02±0,0	0,2±0,1	0,03±0,0	P ₁₋₂ = 0,032 P ₁₋₃ =0,08 P ₂₋₃ = 0,036
КСИ (мИЕ/мл)	11,4±7,7	4,6±2,7	7,0±4,4	P ₁₋₂ = 0,002 P ₁₋₃ = 0,014 P ₂₋₃ = 0,022
ТПА (нмоль/мин мл)	0,5±0,2	5,2±2,6	2,7±1,0	P ₁₋₂ = 0,000 P ₁₋₃ = 0,001 P ₂₋₃ = 0,004
Эластаза (нмоль/мин мл)	0,2±0,1	0,9±0,2	0,7±0,2	P ₁₋₂ = 0,000 P ₁₋₃ = 0,002 P ₂₋₃ = 0,042

Высказанное положение подтверждают следующие фактические данные:

- достоверно более высокая активность эластазы (как в плазме крови, так и в мокроте), ТПП, α_1 -ПИ и α_2 -МГ в мокроте при обострении ХОБЛ инфекционного генеза;

- достоверно меньшая активность КСИ в мокроте у больных с инфекционным обострением ХОБЛ, что может быть обусловлено большей тяжестью воспалительного процесса и истощением местных защитных механизмов у этой категории больных;

- более полная дегрануляция НФ в мокроте и, соответственно, большая активность МПО при инфекционном обострении ХОБЛ;

- активность МПО нейтрофилов в мокроте коррелирует с выраженностью кашля только при обострении ХОБЛ, ассоциированном с инфекцией (R= 0,53, p=0,033).

Таблица 6

Активность миелопероксидазы нейтрофилов в мокроте у больных при инфекционной и неинфекционной этиологии обострения ХОБЛ ($\bar{X} \pm Sx \%$)

Показатели		Больные ХОБЛ, инфекционное обострение (n = 72)	Больные ХОБЛ, неинфекционное обострение (n = 31)	P
		1	2	
Реакция нейтрофилов на МПО	Отрицательная	5,4±1,8	0,4±0,2	0,002
	Слабоположительная	10,2±2,9	16,6±3,8	0,007
	Выраженная	56,1±18,2	52,5±19,6	0,92
	Резко выраженная	28,3±13,9	30,5±17,2	0,78
СЦК		2,2±0,5	2,1±0,5	0,98

Участие инфекционного фактора в патогенезе воспаления при обострении ХОБЛ подтверждает также разный характер корреляций между активностью эластазы и выраженностью клинических симптомов обострения (рис. 5), так, при обострении, ассоциированном с инфекцией, обнаружены прямые связи с выраженностью кашля ($R= 0,51$, $p<0,001$) и количеством мокроты ($R= 0,43$, $p<0,05$), тогда как при обострении неинфекционного генеза - с выраженностью одышки ($R= 0,48$, $p<0,05$).

Вместе с тем, общепризнан факт, что основной причиной воспалительного процесса в центральных и периферических бронхах и легочной паренхиме является курение [Чучалин А.Г., 1998; Barnes P.J., 1997; Magnussen H., 1999, 2000; Hargreave F.E., 1999, 2000; Saetta M., 1998]. Однако не все постоянные и длительные курильщики страдают ХОБЛ и, возможно, не каждый курящий реагирует на табачный дым одинаковым образом [Чучалин А.Г., 1998; Васильева Г.И., 2000; Saetta M., 1999; Yadina Joos et al., 2002]. Имеются немногочисленные работы, в которых приводятся данные о способности оксидантов табачного дыма вызывать в легких дисбаланс в системе протеолиз-антипротеолиз, а именно: инактивировать ингибиторы [Маянский Д.Н., Пикуза О.И., 1993; Crystal R.G. et al., 1989; Lomas D.A., 2000] и повышать активность протеиназ [Cader J.E. et al., 1979, Janoff A. et al., 1983, Anthonisen N. et al., 1994, Barnes P.J., 1997].

Имеются также сведения о способности оксидантов табачного дыма повышать активность МПО нейтрофилов [Bridges R.B. et al., 1985; Hargreave F.E.,

Leigh R., 1999]. Однако активность МПО у курящих и некурящих больных ХОБЛ практически не изучена [Dahlen J. et al., 1999; Hill A.T. et al., 2000].

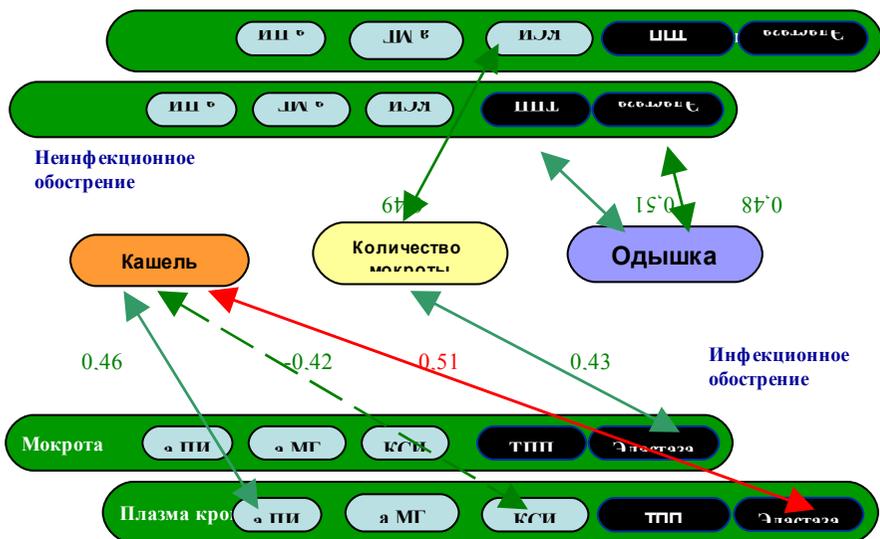


Рис. 5. Корреляционные связи клинических симптомов с активностью биохимических показателей при обострении ХОБЛ неинфекционной и инфекционной этиологии

В соответствии с изложенным, мы изучили активность МПО нейтрофилов и биохимических показателей у курящих и некурящих больных при обострении ХОБЛ. Полученные данные подтверждают однонаправленное, агрессивное действие инфекционного фактора и курения на воспалительный процесс в бронхах. Так, активность МПО нейтрофилов, эластазы и ТПП в мокроте достоверно выше, а активность местных КСИ – ниже при инфекционной этиологии у курящих больных ХОБЛ по сравнению с группами сравнения (табл. 7, рис. 6).

Вместе с тем активность α_2 -МГ в мокроте оказалась достоверно выше при инфекционной этиологии обострения с наибольшей активностью у некурящих больных ХОБЛ. Выявленные взаимосвязи между активностью α_2 -МГ и МПО нейтрофилов ($R = -0,41$, $p = 0,028$) при инфекционном обострении ХОБЛ подтверждают значение ингибитора в качестве биомаркера обострения ХОБЛ инфекционного генеза [Stockley R.S., Bayley D.L., 2000], в первую очередь у некурящих больных. Снижение активности ингибиторов (α_2 -МГ и КСИ) у курящих больных ХОБЛ может быть обусловлено ее подавлением продуктами сгорания табака.

При сравнении клеточного состава ИМ и браш-биоптатов (клетки сопровождения) у больных ХОБЛ с инфекционной и неинфекционной этиологии обострения достоверные различия не были выявлены по большинству показателей за исключением эозинофилов в ИМ и плазмоцитов в браш-биоптатах, количество

которых оказалось достоверно больше при наличии инфекции. На выраженность воспаления при обострении ХОБЛ наряду с инфекционным фактором влияют уровень α_1 -ПИ – основного ингибитора протеиназ, регулирующего активность протеолитических ферментов [Чучалин А.Г., 1991, 1998; Зайчик, Чурилов Л.П.,

Таблица 7

Активность миелопероксидазы нейтрофилов в мокроте у курящих и некурящих больных ХОБЛ ($\bar{X} \pm Sx$ %)

Показатели	Больные ХОБЛ, курящие (n = 67)	Больные ХОБЛ, некурящие (n = 36)	P
	1	2	

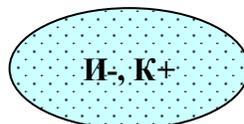
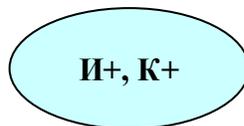
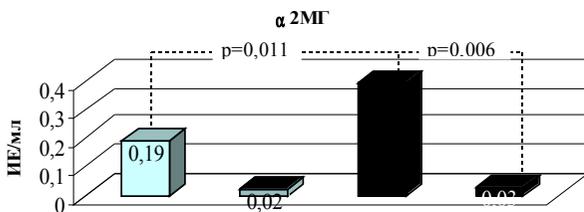
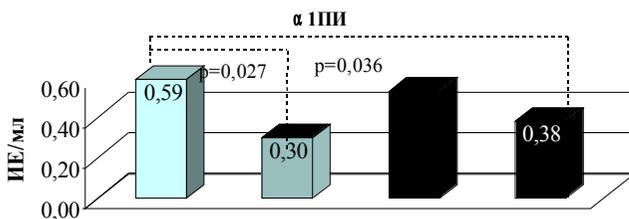
Распределение нейтрофилов по группам в зависимости от степени выраженности реакции на МПО

Отрицательная	3,2±1,8	0,3±0,1	0,017
Слабоположительная	11,4±7,8	35,0±16,3	0,03
Выраженная	54,1±27,3	42,0±26,5	0,51
Резко выраженная	30,3±8,7	22,7±7,5	0,45
СЦК	2,2±0,5	1,8±0,7	0,18

1999; Величковский Б.Т., 2000; Hubbard R.C. et al., 1991; Barnes P.J., 1997; Stockley R.S. et al., 1999, 2000] и фактор курения [Маянский Д.Н., Пикуза О.И., 1993; Чучалин А.Г., 1998; Barnes P.J., 1997; Lomas D.A., 2000]. В соответствии с чем мы провели сравнительный анализ клеточного состава ИМ и браш-биоптатов в зависимости от наличия инфекции, уровня α_1 -ПИ в мокроте и фактора курения.

Выявлено, что на клеточный состав ИМ при обострении ХОБЛ влияют все три фактора: инфекция, курение и уровень ингибитора в мокроте (рис. 7, 8).

Так, действие инфекционного фактора на выраженность воспаления в дыхательных путях достоверно больше у курящих больных и при низкой активности α_1 -ПИ, что находит отражение в изменении клеточного профиля в ИМ в виде существенного увеличения доли НФ и уменьшения доли МФ. Кроме того, значительное увеличение доли ЭФ в ИМ (более 3%) имеет место при неинфекционном обострении ХОБЛ у курящих, либо в сочетании с высокой активностью α_1 -ПИ в мокроте; а также при обострении инфекционной этиологии у некурящих больных ХОБЛ (более 5%). Достоверно меньшая доля ЛФ в ИМ при обострении ХОБЛ имеет место при сочетании курения и инфекции, вместе с тем, наличие инфекционного фактора по-разному влияет на процентное содержание лимфоцитов в ИМ в зависимости от активности α_1 -ПИ. Так, при низкой активности α_1 -ПИ в мокроте доля ЛФ достоверно меньше, а при высокой активности фермента достоверно больше при инфекционном обострении ХОБЛ.



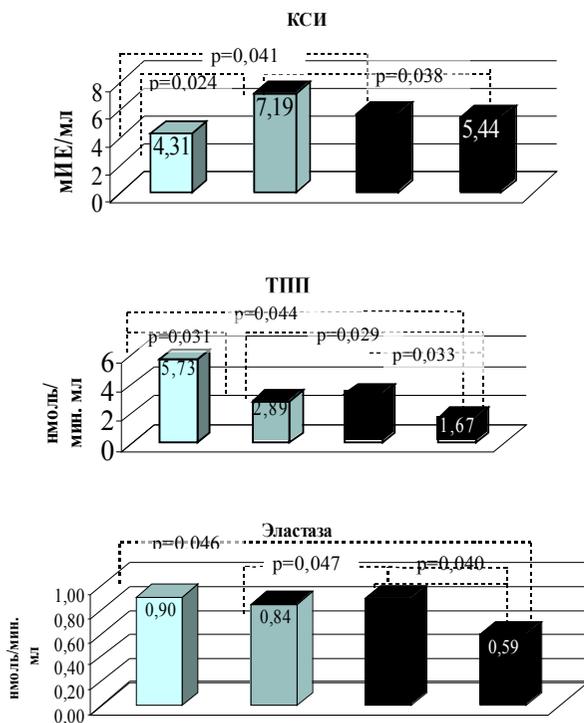


Рис. 6. Сравнительная характеристика активности протеиназ и ингибиторов протеолиза в мокроте в зависимости от фактора курения и наличия инфекции

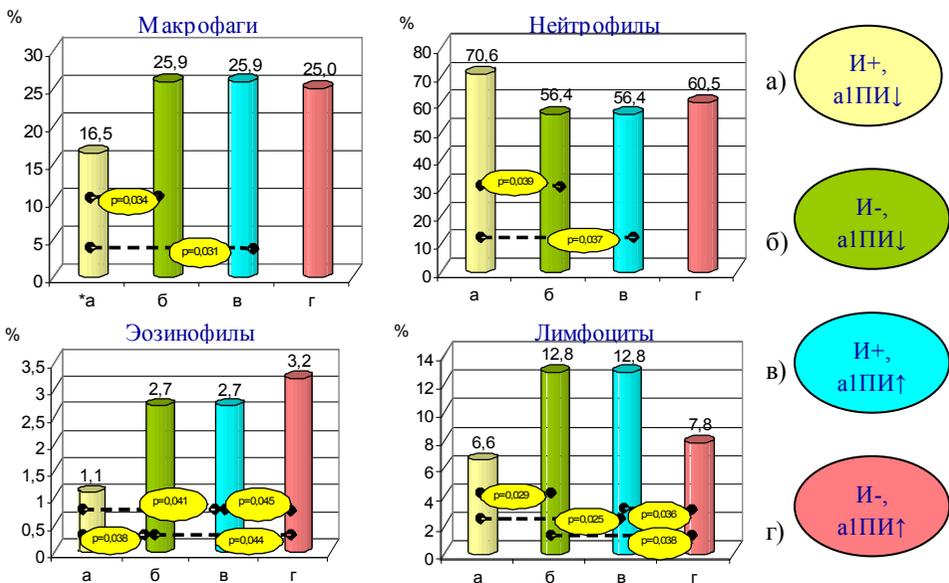


Рис. 7. Сравнительная характеристика цитогрaмм ИМ в зависимости от наличия инфекции и уровня α1ПИ в мокроте при обострении ХОБЛ

Разнонаправленный характер изменения количества клеток в ИМ: с одной стороны, НФ, а с другой – ЭФ и ЛФ подтверждает высказанную ранее точку зрения о том, что при обострении ХОБЛ ЭФ и ЛФ находятся в антагонистических отношениях с НФ и выполняют противоположные им функции. Так, доказано, что НФ оказывают супрессивный, цитостатический эффект на ЛФ [Лаврова В.С. и др., 1992], а те, в свою очередь, вырабатывают фактор торможения миграции НФ [Маянский Д.Н., Маянский А.Н., 1997]. ЭФ, в свою очередь, играют важную роль в образовании и доставке антимицетиков в очаг воспаления. В них содержатся: гистаминаза, разрушающая гистамин, карбоксипептидаза, вызывающая распад кининов, супероксиддисмутаза и каталаза, инактивирующие активные радикалы кислорода [Серов В.В., Пауков В.С., 1995].

Высказанное положение подтверждают отрицательные корреляции между НФ и ЭФ, НФ и ЛФ и положительная – между ЛФ и ЭФ (рис. 9).

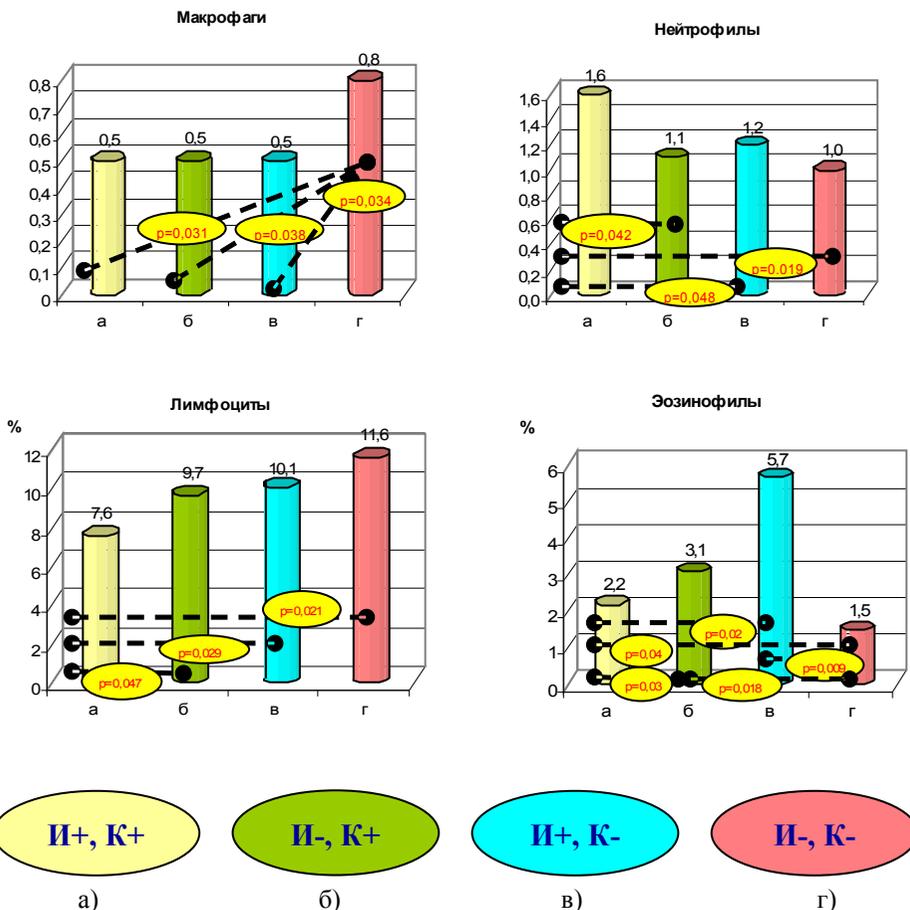


Рис. 8. Сравнительная характеристика клеточного состава ИМ при обострении ХОБЛ в зависимости от фактора курения и наличия инфекции

Полученные данные в отношении НФ как основных клеток-эффекторов в сложной иерархии межклеточных взаимодействий при обострении ХОБЛ совпадают с результатами исследования ряда авторов [Keatings V., Barnes P.J., 1997; Saetta M., 1997; Kips J.C. et al., 1998; Peleman R.A., Ryttila et al., 1999; Anto J.M., 2000; Pavord G.D., 2002]. В то же время имеющиеся сведения о количестве и роли эозинофилов у больных ХОБЛ противоречивы [Keatings V. Et al., 1997; Gibson P. et al., 1998; Cosio V. G. et al, 1999; Pavord J.D., 2002]. По мнению S. Gompetz и R. Stockley (2000) имеются явные доказательства присутствия эозинофилов в бронхах больных ХОБЛ, хотя их роль в бронхиальном воспалении представляется все еще недостаточно ясной.

существенные различия между некурящими больными ХОБЛ в зависимости от наличия или отсутствия инфекционного фактора как причины обострения болезни.

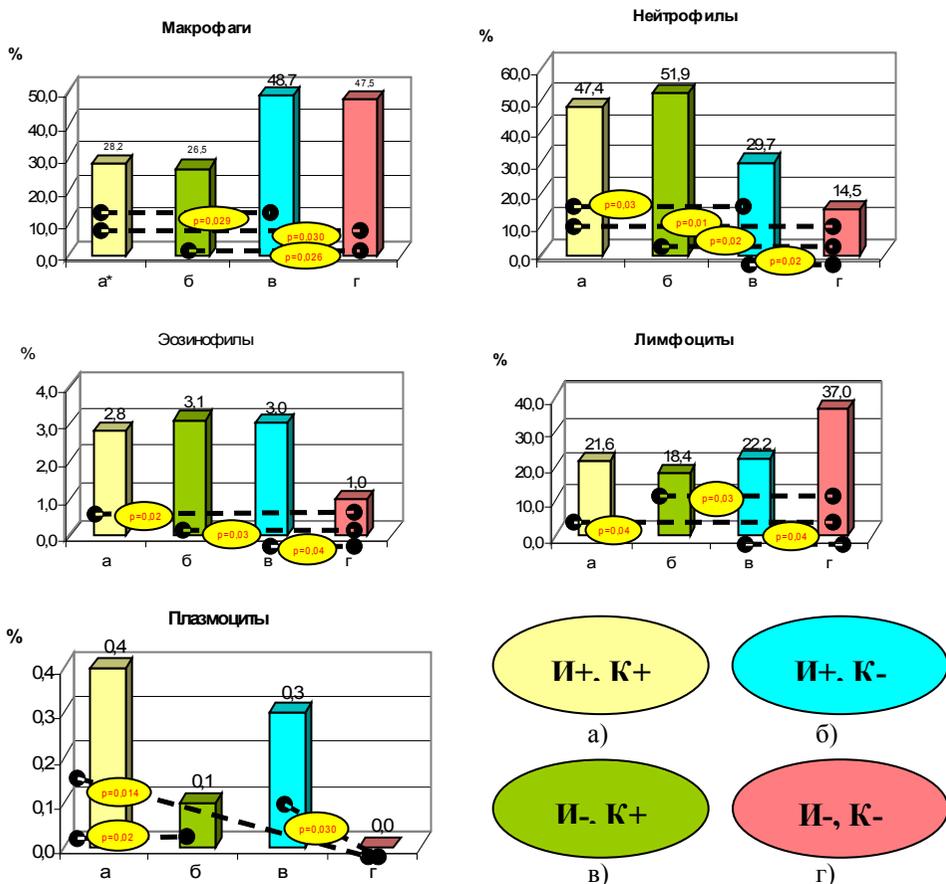


Рис. 10. Сравнительная характеристика цитологического состава клеток сопровождения браш-биоптатов при обострении ХОБЛ в зависимости от наличия инфекции и фактора курения

Так, при неинфекционной этиологии обострения у некурящих больных ХОБЛ достоверно меньше активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ в мокроте, уровень ФНО α в мокроте, содержание НФ и ЭФ в ИМ, но обращает внимание достоверно более высокое содержание в пристеночной слизи лимфоцитов (37%), что существенно превышает их количество как в группе сравнения, так и у курящих больных ХОБЛ (рис. 10). Неожиданными и несколько парадоксальными оказались полученные нами данные о большей выраженности повреждения слизистой бронхов у этой категории больных - обострение неинфекционной этиологии у некурящих, что характеризуется достоверно большим количеством реснитчатых эпителиоцитов с признаками

дистрофии и атрофии, меньшим числом реснитчатых эпителиоцитов с признаками пролиферации и очень низким количеством реснитчатых эпителиоцитов нормального строения, которое оказалось существенно ниже такового как в группе сравнения (некурящие больные с обострением инфекционной этиологии), так и у курящих больных ХОБЛ (рис. 12).

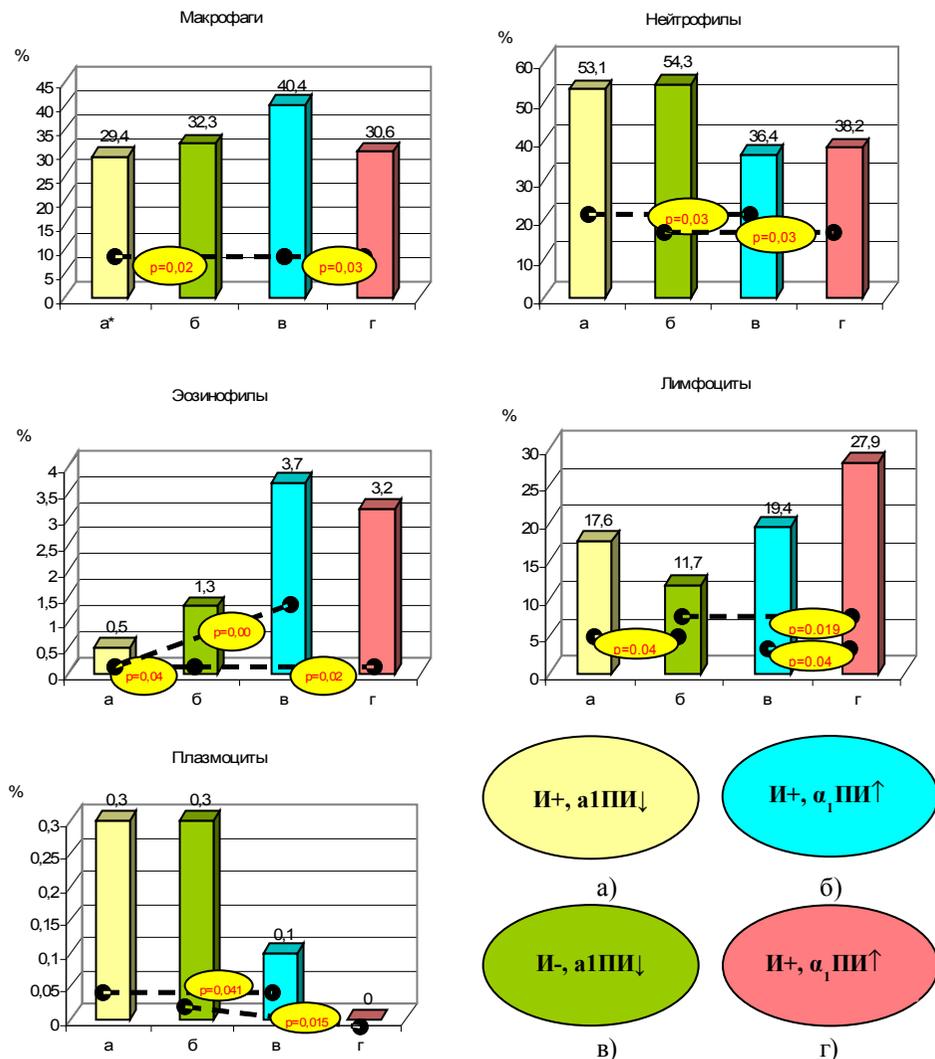
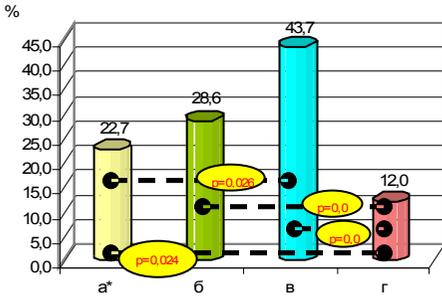
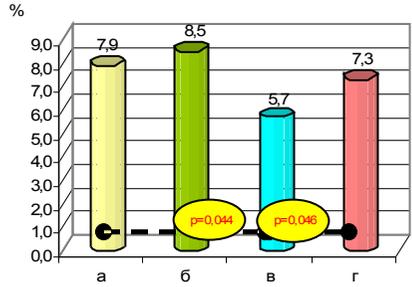


Рис. 11. Сравнительная характеристика цитологического состава клеток сопровождения браш-биоптатов при обострении ХОБЛ в зависимости от наличия инфекции и уровня α_1 ПИ в мокроте

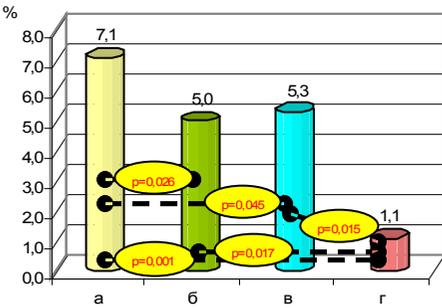
Реснитчатые эпителиоциты нормального строения



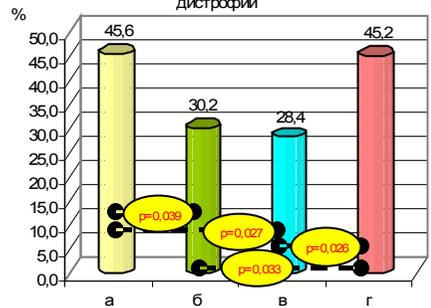
Резервные клетки



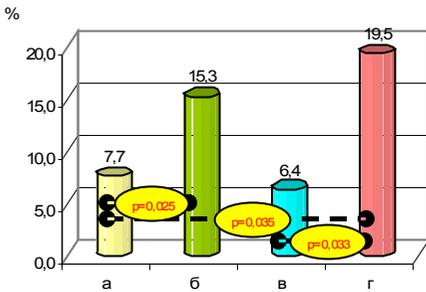
Метаплазированные плоскоэпителиальные клетки



Реснитчатые эпителиоциты с признаками дистрофии



Реснитчатые эпителиоциты с признаками атрофии



Реснитчатые эпителиоциты с признаками пролиферации

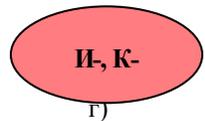
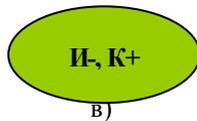
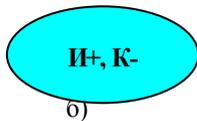
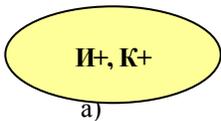
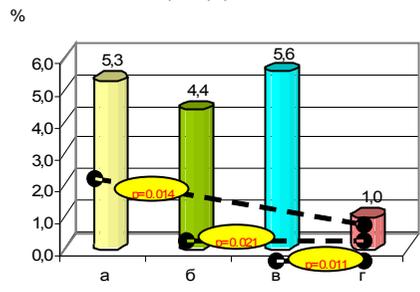


Рис. 12. Сравнительная характеристика цитологического состава эпителиоцитов браш-биоптатов при обострении ХОБЛ в зависимости от наличия инфекции и фактора курения

Также имеет место достоверно большее содержание МЭЛФ и МЭЭФ в 1 мм² стромы, тогда как у некурящих при наличии инфекционного фактора преобладали интраэпителиально расположенные эозинофилы при практическом их отсутствии в строме слизистой. Таким образом, обострение неинфекционной этиологии у некурящих больных ХОБЛ характеризуется более выраженным повреждением эпителия слизистой бронхов и наиболее высоким содержанием как в просвете бронхов, так и интраэпителиально расположенных лимфоцитов, что может быть обусловлено генетически детерминированным клеточным ответом на цитотоксические вещества. Складывается впечатление, что группа некурящих больных ХОБЛ неоднородна и особого внимания заслуживают больные с неинфекционным характером обострения болезни.

Для того, чтобы выделить главные скрытые (причинные) факторы, определяющие функциональную роль различных компонентов, реализующих хроническую воспалительную реакцию в организме при обострении ХОБЛ, был проведен факторный анализ эффекторов и медиаторов воспаления с применением метода главных компонент и варимаксным нормализованным вращением осей в факторном пространстве. Найдены факторные нагрузки, то есть коэффициенты корреляции этих латентных факторов с исходными показателями состояния воспалительной реакции в организме больного: клетками-эффекторами, протеиназами, их ингибиторами и цитокинами. Почти вся изменчивость выраженности воспаления определялась во всех исследованных случаях первыми тремя главными факторами (процент накопления дисперсии от 91,98% до 94,96%). В связи с этим факторный анализ компонентов, реализующих ответ организма на обострение ХОБЛ, проведен с выделением трех главных факторов: при обострении ХОБЛ неинфекционной этиологии, во всей группе больных с инфекционной этиологией обострения ХОБЛ, а также отдельно при обострениях, вызванных наиболее частыми возбудителями инфекционного процесса: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *M. pneumoniae*.

По степени убывания значимости главные компоненты воспалительной реакции расположились следующим образом: первым по значимости во всех перечисленных группах является клеточный фактор, структурные составляющие второго и третьего латентных факторов изменялись в зависимости от этиологии обострения ХОБЛ.

В случае обострения инфекционной этиологии кажется парадоксальным, что главный латентный фактор отрицательно коррелирует с нейтрофильной реакцией на воспаление и положительно – с макрофагальной. Однако при более детальном рассмотрении с учетом конкретного возбудителя обострения сходные по направленности реакции обнаружены при обострении хламидийной и микоплазменной этиологии, то есть при внутриклеточной локализации патогена. Вместе с тем, внеклеточная локализация патогенов подтверждает общепризнанную точку зрения на НФ как на основные клетки воспалительной реакции при

бактериальной инфекции [Маянский Д.Н., 1991, 1997; Серов В.В., Пауков В.С., 1995; Полосухин В.В., 1997; Коваленко В.Л. и др. 1998]. Более того, по данным настоящего исследования оказалось, что и при неинфекционной этиологии обострения ХОБЛ роль НФ остается достаточно значимой в реализации воспалительной реакции [Fahy J.Y., 1995; Roberto W., Dal Negro et al., 2002]. Однако, по величине факторной нагрузки можно судить о более существенном вкладе эозинофилов в реализацию воспаления неинфекционного генеза. Но если при неинфекционной этиологии обострения главный латентный фактор положительно коррелирует с эозинофильной реакцией на воспаление, то при обострении, ассоциированном с инфекцией, имеет место отрицательная связь, что подтверждает высказанное ранее предположение о противоположном патогенетическом действии эозинофилов при инфекционном и неинфекционном обострении ХОБЛ.

Второй латентный фактор также существенным образом различается. При инфекционном обострении ХОБЛ роль второго скрытого фактора ложится на клеточные медиаторы (ФНО α и ИЛ-8 мокроты), а при отсутствии инфекции – на протеиназы крови и мокроты. Третий латентный фактор в том и другом случае представлен системной реакцией организма на воспаление. Однако при обострении, ассоциированном с инфекцией, главным его компонентом является высокий уровень в крови ФНО α , а при неинфекционном обострении третий латентный фактор отражает повышенную активность ингибиторов протеиназ в плазме крови.

Таким образом, имеются существенные различия в механизмах воспаления при инфекционной и неинфекционной этиологии обострения ХОБЛ и как результат, существенные различия в повреждающем эффекте и структурной перестройке эпителия бронхов. Так, при инфекционной этиологии обострения ХОБЛ наблюдается высокий уровень пролиферативной активности эпителиоцитов с исходом в плоскоклеточную метаплазию (рис. 13, 14), тогда как при обострении неинфекционного генеза имеет место истощение регенераторных процессов с развитием атрофии слизистой бронхов. Обнаруженные качественно разные типы структурных реакций бронхиального эпителия [Коваленко В.Л. и др., 1998; Непомнящих Г.И. и др., 1997, 2000], вероятно, отражают разные механизмы поражения дыхательных путей при инфекционной и неинфекционной природе воспалительного процесса при ХОБЛ.

В случае обострения пневмококковой этиологии главная роль в реализации воспалительной реакции организма (судя по факторным нагрузкам) принадлежит клеточным эффекторам. Воспаление в этом случае положительно коррелирует с нейтрофильной реакцией и отрицательно – с реакцией других клеток на инфекционный агент, что отражает их антагонистические отношения в реализации воспалительного ответа при обострении ХОБЛ у этой категории больных. В том числе это относится и к эозинофилам, количество которых в просвете бронхов достоверно превышало таковое при инфекционном процессе другой этиологии, что подтверждает существующую точку зрения о том, что эозинофилия может иметь место при обострении ХОБЛ инфекционной этиологии [Jeffery P.K., 1999] и наиболее вероятно при наличии в дыхательных путях *S. pneumoniae* [Голуб Н.И.,

1996]. Второй и третий латентные факторы отражают приоритет неспецифического звена воспалительной реакции при обострении ХОБЛ пневмококковой этиологии,

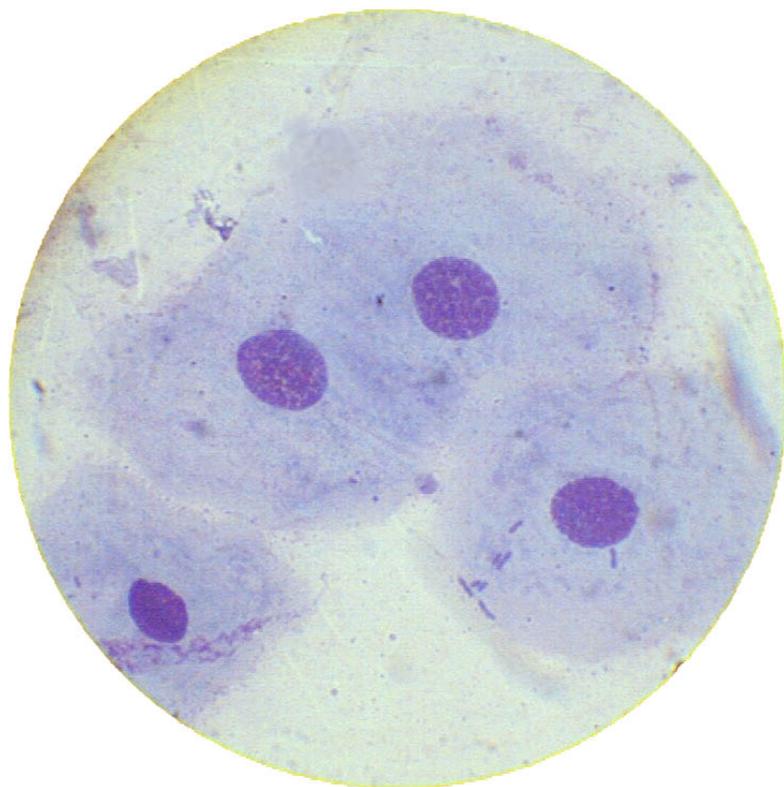


Рис. 13. Браш-биопсия. Метаплазия эпителия слизистой. Группа клеток плоского эпителия. ХОБЛ, инфекционное обострение. Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение $\times 1500$. Иммерсия

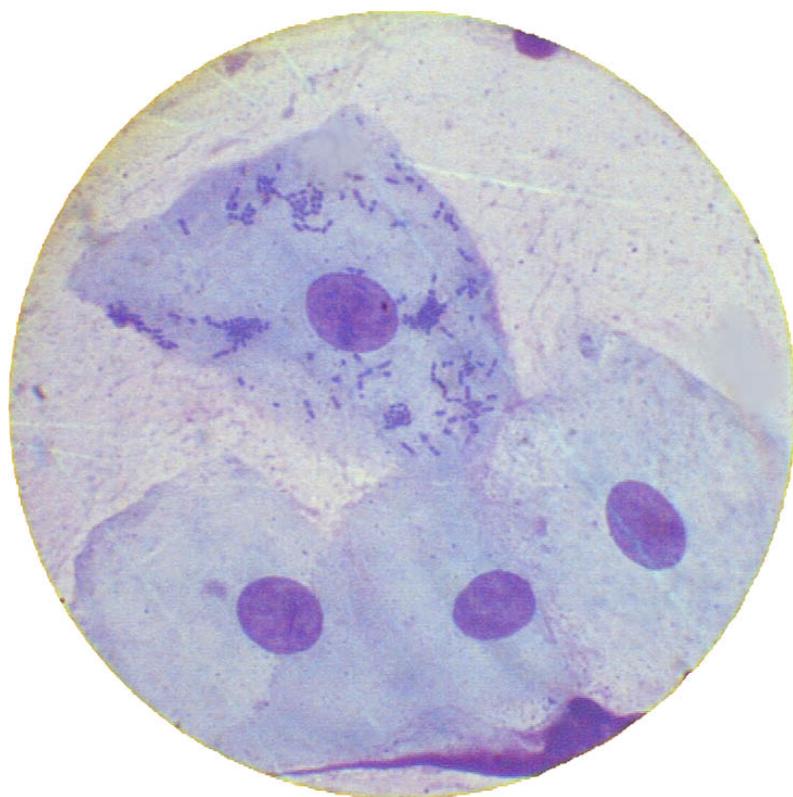


Рис. 14. Браш-биопсия. Плоскоклеточная метаплазия эпителия слизистой бронха. Колонии микроорганизмов в цитоплазме эпителиоцитов. ХОБЛ, обострение, внутриклеточная локализация инфекционного агента. Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение $\times 1500$. Иммерсия

что сопровождается массивным повышением протеиназной активности с формированием дефицита их ингибиторов на фоне пневмококковой инфекции.

Полученные результаты отражают особенности биохимического реагирования органов и систем организма при воспалении бронхов и легких, в данном случае при обострении ХОБЛ [Федосеев Г.Б., Немцов В.И., 1998].

Обострение, вызванное гемофильной палочкой, сопровождается аналогичными клеточными реакциями (главный латентный фактор), тогда как второй латентный фактор положительно коррелирует с клеточными медиаторами в мокроте (ФНО α , ИЛ-8) и отрицательно - с активностью α_1 ПИ и α_2 МГ в крови, что отражает дефицит ингибиторов системной воспалительной реакции организма. Третий латентный фактор, напротив, положительно связан с активностью протеиназ, ИЛ-8 в крови и усугублен отрицательной корреляцией с местной активностью ингибиторов протеиназ. Это объясняет более тяжелое течение обострения ХОБЛ, ассоциированного с *H. influenzae*, что характеризуется наиболее существенными структурными изменениями бронхиального эпителия в виде достоверно большего количества реснитчатых эпителиоцитов с признаками дистрофии – $56,3 \pm 12,6\%$ и, соответственно, более низкого содержания реснитчатых эпителиоцитов нормального строения – $13,5 \pm 4,7\%$, а также более выраженной бронхообструкцией ($ОФВ_1 = 44,8 \pm 7,4\%$) по сравнению с обострениями, вызванными другими инфекционными агентами. Полученные результаты подтверждают точку зрения Т.Ф. Murphy (2000) и М. Miravillis и соавт. (1999) о значении *H. influenzae* в патогенезе ХОБЛ тяжелого течения.

Внутриклеточная локализация возбудителя сопровождается иной расстановкой факторных нагрузок в клеточном компоненте реализации воспаления (главный латентный фактор). Так, острота воспалительной реакции положительно коррелирует с активностью МФ и отрицательно с активностью НФ, что подтверждает значение МФ в патогенезе воспаления, вызванного внутриклеточными микроорганизмами [Фримель Х., Брок Й., 1986; Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 1999; Абелев Г.И., 1996], тогда как НФ самостоятельно способны к защите лишь от внеклеточных патогенов [Долгушин И.И., 2002]. Однако при обострении хламидийной этиологии главный латентный фактор положительно коррелирует не только с макрофагальной, но и с лимфоцитарной воспалительной реакцией. Это отражает более тяжелое повреждающее действие этого патогена на дыхательные пути и совпадает с результатами исследования М.Ф. Lipscomb и соавт. (2000), которые получили данные о значении лимфоцитов в повреждении легких внутриклеточными микроорганизмами. Тяжелое повреждающее действие *S. pneumoniae* характеризуют следующие факты: достоверно более высокое содержание в слизи бронхов дистрофически измененных эпителиоцитов – $52,0 \pm 10,0\%$ (наряду с *H. influenzae*), метаплазированных плоскоэпителиальных клеток – $9,1 \pm 3,4\%$, низкое содержание реснитчатых эпителиоцитов нормального строения – $14,9 \pm 3,1\%$, а также более выраженная бронхообструкция ($ОФВ_1 = 54,5 \pm 11,7\%$) по сравнению с обострением, вызванным другими инфекционными агентами (за исключением *H. influenzae*). Второй и третий латентные факторы в случае

внутриклеточных патогенов в качестве структурных звеньев содержат цитокины, показатели активности протеиназ и их ингибиторов. Причем в формировании воспаления при хламидийной этиологии обострения большее значение принадлежит повышению активности протеиназ, а в случае микоплазменной этиологии – дефициту их ингибиторов, но как в том, так и в другом случае компонентом системной реакции организма на воспаление является высокий уровень в крови ФНО α (рис. 15).

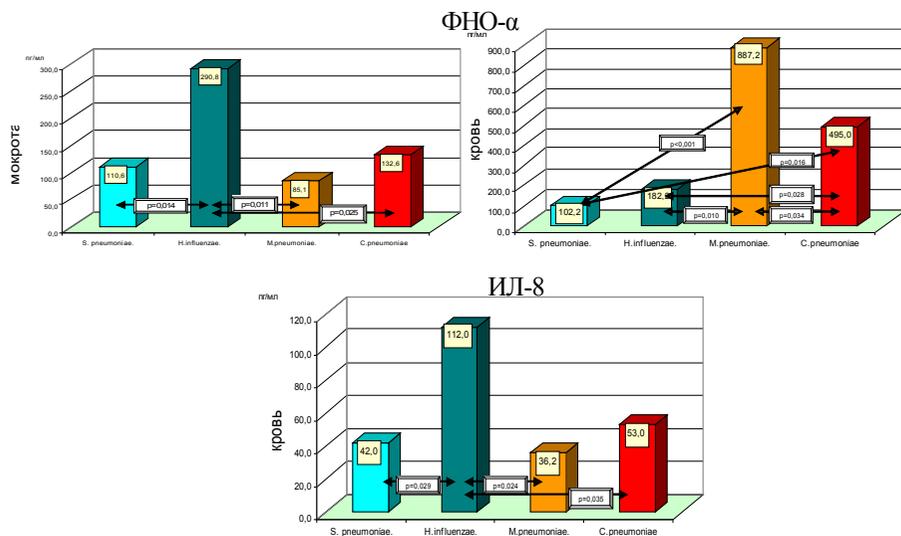


Рис. 15. Сравнительная характеристика уровней ФНО- α и ИЛ-8 в крови и мокроте в зависимости от вида возбудителя инфекционного процесса

В настоящее время принято выделять две формы сосуществования микроорганизма и хозяина при ХОБЛ: инфекция и колонизация [Monso E. et al., 1995, 1998; Martinez J., 1997; Чучалин А.Г., 1998; Wilson R., 1999; de Benzmann S. et al., 2000; Stockley R., 2000; Sethi S., Murphy T.F., 2001]. Под колонизацией понимают наличие микроорганизмов в нижнем респираторном отделе при стабильном течении ХОБЛ, то есть вне обострения. Если наличие персистирующего воспаления в фазу клинической ремиссии ХОБЛ является практически общепризнанным фактом [Chalmers G.W. et al., 1999; Rutgers S.R. et al., 2000; Fabbri Z.M. et al., 2001], то имеются лишь единичные сведения о значении колонизации при стабильном течении ХОБЛ. Так, имеется информация о том, что микробы, вызвав патологический процесс, со временем не исчезают, а, сохраняясь в организме, выделяют во внешнюю среду: липополисахариды, пептидогликаны и другие продукты своей жизнедеятельности, которые сами по себе являются индукторами воспаления [Саркисов Д.С., Хитров Н.К., 2000; Van Alphen L., 1995; Cole P., 1997; Hill A.T. et al., 2000; Sethi S., Murphy T.F., 2001]. Для решения вопроса о частоте и характере колонизации при стабильном течении ХОБЛ мы обследовали 53 больных в фазу клинической ремиссии болезни. Микроорганизмы были выделены только у

41,5% больных, что достоверно реже, чем в период обострения ХОБЛ ($p < 0,001$). Причем оказалось, что нижний респираторный тракт колонизируют практически те же микроорганизмы, которые были выделены при обострении болезни. Однако имеет место тенденция увеличения частоты выделения *H. influenzae* и *S. pneumoniae*, хотя статистические различия не достоверны. Тогда как *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* были обнаружены достоверно реже, а *M. catarrhalis* не выделена ни в одном случае стабильного течения ХОБЛ. Значение *H. influenzae* как основного инфекционного агента, колонизирующего респираторный тракт у больных в стабильную фазу ХОБЛ, подтверждают результаты исследования ряда авторов [Богданова Т.М. и др., 2000; Martinez J., 1997; Wilson R., 1999; de Bentzmann et al., 2000; Hill A.T. et al., 2000].

Далее мы попытались ответить на вопрос, влияет ли колонизация на активность воспалительного процесса в фазу клинической ремиссии ХОБЛ? В связи с чем мы сравнили активность биохимических и цитологических показателей в мокроте у здоровых и в общей группе больных ХОБЛ в фазу клинической ремиссии, а также отдельно у здоровых и больных в зависимости от вида ремиссии: 1-я группа – клиническая ремиссия с элиминацией микробов из мокроты; 2-я группа – больные, у которых в фазу клинической ремиссии уменьшилось количество микробов в ассоциации и/или их концентрация в 1 мл мокроты (клиническая ремиссия с колонизацией). Оказалось, что клиническая ремиссия с колонизацией характеризуется достоверно более высоким содержанием НФ и более высокой активностью протеиназ по сравнению с группой здоровых, что свидетельствует о продолжающемся воспалении у этих больных. Только при клинической ремиссии ХОБЛ, характеризующейся элиминацией патогена из нижнего респираторного тракта, активность протеиназ и клеточный профиль индуцированной мокроты достоверно не отличались от таковых в группе здоровых, что подтверждает значимость инфекции в патогенезе воспаления ХОБЛ.

В общей группе больных ХОБЛ, находящихся в фазе клинической ремиссии, так же, как и в группе «ремиссия с колонизацией», выраженность воспалительного процесса достоверно больше, чем в группе здоровых, но меньше, чем при обострении ХОБЛ. Однако клиническая ремиссия ХОБЛ не отличается от фазы обострения по содержанию в ИМ и браш-биоптатах НФ, что свидетельствует о продолжающемся воспалении. Кроме того, клиническая ремиссия ХОБЛ отличалась от предшествующей фазы обострения болезни более выраженными изменениями в слизистой бронхов: достоверно меньшим содержанием реснитчатых эпителиоцитов нормального строения и большим содержанием реснитчатых эпителиоцитов с признаками дистрофии (рис. 16). Обнаруженные изменения в цитогамме браш-биоптатов у больных ХОБЛ в фазу клинической ремиссии свидетельствуют не только о продолжающемся воспалении, но и подтверждают положение о том, что основой прогрессирования болезни являются патоморфологические изменения при обострении ХОБЛ. Каждое следующее обострение усугубляет повреждение эпителиальных клеток и приводит к необратимым структурным изменениям в слизистой бронхов в фазу клинической ремиссии болезни [Полосухин В.В., 1997;

Коваленко В.А. и др., 1998; Ball P. et al., 1995; Jeffery P.K., 1996; Grossman R.F., 2003; Gold D., 2003].

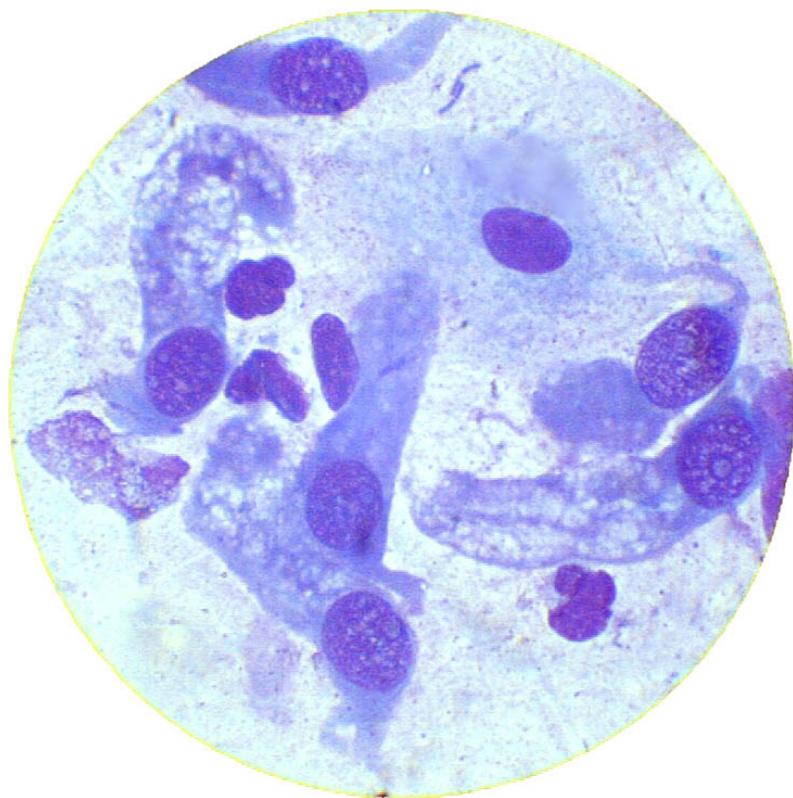


Рис. 16. Браш-биопсия. Дистрофически измененные клетки реснитчатого эпителия. Вакуолизация цитоплазмы клеток, потеря ресничек. ХОБЛ, клиническая ремиссия. Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение x1500. Иммерсия

ХОБЛ – заболевание, имеющее соответствующую стадийность, причем для каждой из стадий характерна определенная функциональная и морфологическая характеристика [GOLD 2003; Чучалин А.Г., 2003]. Вместе с тем отсутствуют данные в отношении выраженности воспаления при обострении ХОБЛ в зависимости от стадии болезни. В соответствии с чем мы провели сравнительный анализ клеточного состава ИМ и активности биохимических показателей при обострении ХОБЛ в зависимости от стадии болезни (рис. 17, 18).

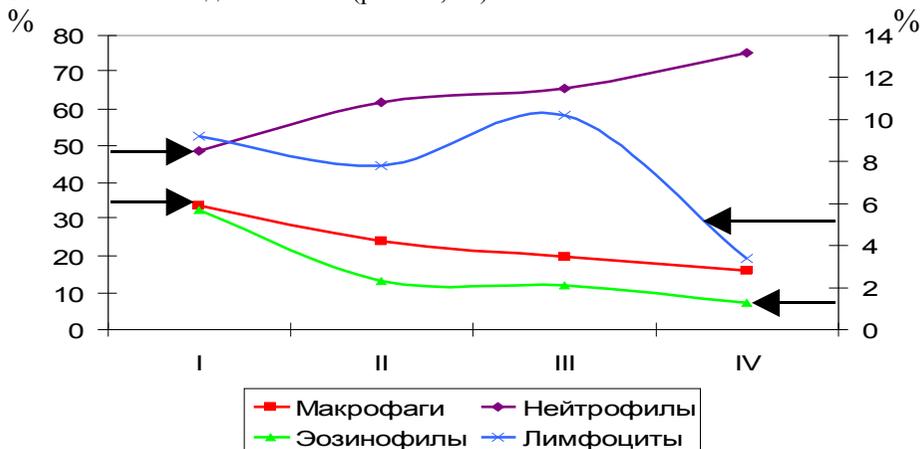


Рис. 17. Особенности клеточного состава индуцированной мокроты при обострении ХОБЛ в зависимости от стадии болезни

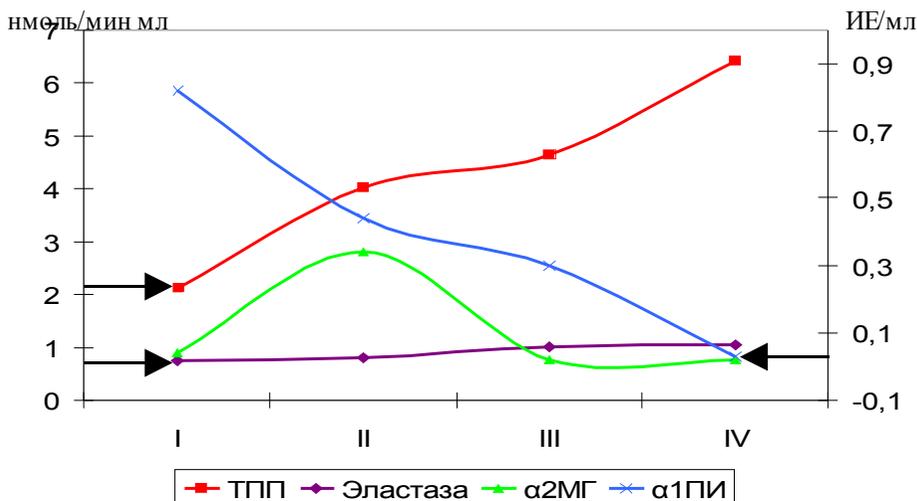


Рис. 18. Активность протеиназ и ингибиторов в мокроте при обострении ХОБЛ в зависимости от стадии болезни

При I стадии ХОБЛ содержание МФ и активность α_1 ПИ оказались достоверно больше, а содержание НФ достоверно меньше по сравнению с таковыми при более тяжелых стадиях болезни. Обращает внимание высокая активность протеиназ при всех стадиях ХОБЛ, при достоверном снижении активности ингибиторов: α_1 ПИ уже при II, а α_2 МГ при III стадии болезни. При IV стадии ХОБЛ обострение характеризуется наибольшим количеством НФ ($75,21 \pm 1,91\%$) при достоверно меньшем количестве таких клеток-эффекторов, как лимфоциты и эозинофилы.

Таким образом, только при I стадии ХОБЛ обострение характеризуется меньшей выраженностью воспаления в бронхах, тогда как, уже начиная со II стадии болезни, имеет место высокая активность воспалительного процесса, выраженность которого остается высокой и даже увеличивается при прогрессировании болезни, что подтверждает значение воспаления в патогенезе ХОБЛ.

Итак, в результате проведенного исследования можно сделать следующее заключение: инфекционный фактор существенным образом влияет на воспалительный процесс при обострении ХОБЛ - инфекция является важным элементом, соучаствующим в патогенезе воспаления как при обострении, так и в фазе клинической ремиссии ХОБЛ. Но характер и выраженность воспаления зависят не только от наличия инфекционного фактора, но и от вида конкретного инфекционного агента. Наибольшей выраженностью воспалительного процесса и большим повреждающим действием на бронхиальный эпителий характеризуются обострения, ассоциированные с *H. influenzae* и *S. pneumoniae*. Наименьшим повреждающим действием на эпителий бронхов обладают *S. pneumoniae* и *M. catarrhalis*, последняя в большей степени. Это, вероятно, связано с разными механизмами воспаления при инфекционной и неинфекционной этиологии обострения, а также зависит от вида конкретного возбудителя инфекционного процесса.

Установлена роль гена NRAMP1 в формировании клинических особенностей течения заболевания: так, возраст начала заболевания и степень обструкции дыхательных путей связаны с аллельным вариантом гена NRAMP1 (1465-85G/A и D543N полиморфизма), а также установлена значимость полиморфизмов D543N и 469+14G/C гена NRAMP1 в регуляции активности ингибиторов протеиназ, имеющих важное значение в патогенезе ХОБЛ. Полученные на сегодняшний день результаты открывают перспективы будущих исследований, которые позволят понять эндогенные механизмы формирования ХОБЛ.

Выводы

1. У 70% больных ХОБЛ обострение имеет инфекционную этиологию. Наиболее значимым этиологическим агентом является *S. pneumoniae* (41,5%). Значительную роль в этиологии обострения ХОБЛ играют внутриклеточные патогены (31,1%), причем *S. pneumoniae* чаще в ассоциации с *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, а *M. pneumoniae* в виде моноинфекции. У некурящих больных ХОБЛ и при отсутствии в анамнезе профессиональных вредностей преобладают обострения, вызванные моноинфекцией, наиболее часто - *S. pneumoniae*.
2. Обострение ХОБЛ, вызванное микстинфекцией, характеризуется более существенным повреждением слизистой бронхов и более выраженной воспалительной реакцией по сравнению с моно- и неинфекционной этиологией.
3. Выраженность воспалительной реакции и степень повреждения бронхиального эпителия при обострении ХОБЛ зависят от вида конкретного инфекционного агента. Наиболее тяжелым течением характеризуется обострение ХОБЛ, ассоциированное с *H. influenzae* и *S. pneumoniae*, что сопровождается более выраженными дистрофическими изменениями эпителиоцитов и тяжелой бронхообструкцией.
4. На выраженность воспаления при обострении ХОБЛ влияют наличие инфекции, фактор курения и низкая активность α 1ПИ в мокроте, что сопровождается большей выраженностью воспалительного процесса. Так, уровень провоспалительных цитокинов в мокроте достоверно выше при инфекционной этиологии обострения и у курящих больных ХОБЛ. Воспаление при обострении ХОБЛ, вызванном внутриклеточными патогенами, характеризуется высоким уровнем ФНО α в периферической крови.
5. При ХОБЛ для воспалительного процесса, ассоциированного с инфекцией, характерен высокий уровень пролиферативной активности эпителиоцитов с исходом в плоскоклеточную метаплазию, тогда как для воспаления неинфекционного генеза – истощение регенераторных процессов с развитием атрофии слизистой бронхов.
6. Для ХОБЛ характерны прямые корреляции между выраженностью основных клинических симптомов обострения и показателями активности воспалительного процесса: при инфекционной этиологии - кашель и количество мокроты связаны с активностью эластазы и миелопероксидазы нейтрофилов в мокроте, а при неинфекционной этиологии одышка - с активностью эластазы в крови.
7. Маркерами обострения инфекционной этиологии у курящих больных ХОБЛ является повышение в мокроте активности трипсиноподобных протеиназ (выше 5,0 нмоль/мин мл), а у некурящих - α 2 макроглобулина (выше 0,3 ИЕ/мл).

8. При I стадии ХОБЛ обострение характеризуется меньшей выраженностью воспаления в бронхах, тогда как уже при II стадии болезни имеет место достоверно более высокое содержание нейтрофилов и низкое содержание макрофагов в индуцированной мокроте, а также достоверно более высокая активность трипсиноподобных протеиназ и низкая активность $\alpha 1$ протеиназного ингибитора в мокроте.
9. В фазу клинической ремиссии при колонизации микробами нижнего респираторного тракта продолжается активный воспалительный процесс в бронхах. Клиническая ремиссия ХОБЛ отличается от предшествующей ей фазы обострения болезни более выраженными дистрофическими изменениями эпителиоцитов.
10. Сроки манифестации хронической обструктивной болезни легких детерминированы 1465-85G/A полиморфизмом гена NRAMP1, в то время как степень выраженности бронхообструкции связана с D543N полиморфизмом этого гена. Активность ингибиторов протеаз определяется полиморфизмами D543N и 469+14G/C гена NRAMP1.

Рекомендации для внедрения в практику

1. При обострении ХОБЛ у больных с I - II стадиями болезни в связи с превалирующей ролью *S. pneumoniae* как причины инфекционного процесса рекомендуются в качестве препаратов выбора антибиотики пенициллинового ряда. У больных с III -IV стадиями болезни высока вероятность - *H. influenzae* и/или *S. pneumoniae* как причины обострения ХОБЛ и рекомендуется назначение макролидов, либо респираторных фторхинолонов.
2. Для диагностики обострения ХОБЛ и мониторинга эффективности проводимой терапии рекомендовано определение активности миелопероксидазы нейтрофилов, активности эластазы и трипсиноподобных протеиназ в мокроте. Маркерами обострения инфекционной этиологии является высокая активность трипсиноподобных протеиназ (выше 5,0 нмоль/мин мл) у курящих и $\alpha 2$ макроглобулина (выше 0,3 ИЕ/мл) в мокроте у некурящих больных ХОБЛ.
3. В качестве маркеров диагностики воспаления при ХОБЛ может использоваться цитологический состав индуцированной мокроты, в котором интенсивность воспаления отражает повышенное содержание нейтрофильных лейкоцитов.
4. При отсутствии атопии и описторхоза маркером обострения инфекционной, наиболее вероятно, пневмококковой этиологии, может быть наличие эозинофилии в индуцированной мокроте (более 5%) у некурящих больных ХОБЛ;
5. Начиная со II стадии ХОБЛ при обострении показано назначение препаратов обладающих противовоспалительным действием (фенспирид).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Букреева Е.Б. Бактериология бронхиального секрета при хроническом бронхите и раке легкого // Сб.: Вопросы теоретической и клинической медицины. Томск, 1982 – Вып. 9.– С. 14-15
2. Штейнгардт Ю.Н., Букреева Е.Б., Христолюбова Е.И., Еникеев Р.Р. Взаимосвязь обострений хронического бронхита и эндобронхиальной инфекции // Сб.: Хронический бронхит и легочное сердце. Л., 1983.– С.18-19.
3. Штейнгардт Ю.Н., Букреева Е.Б., Христолюбова Е.И., Русакова Е.В., Алексеенкова Л.И. Взаимосвязь обострения воспаления и инфекции при хроническом бронхите / Клиническая медицина. 1984, №12.–С.73-74.
4. Букреева Е.Б., Агеева Т.С., Христолюбова Е.И. Влияние отмычки мокроты на результаты бактериологического и цитологического исследований / Лабораторное дело. 1984.–№10.– С. 601-604.
5. Букреева Е.Б. Чувствительность к антибиотикам пневмококка, выделенного при хроническом бронхите и бронхиальной астме / Антибиотики и мед биотехнология.–1985.–№8.– С. 614-615.
6. Букреева Е.Б., Агеева Т.С., Христолюбова Е.И. Критерии и методы этиологической диагностики острых и хронических воспалительных процессов в легких / Терапевтический архив.– 1985.–№5.– С. 39 -42.
7. Немеров Е.В., Букреева Е.Б., Христолюбова Е.И. Сравнительное исследование трансбронхиальных аспиратов и мокроты / Статья депонирована во ВНИИИМИ МЗ СССР, №10310-85.
8. Букреева Е.Б., Немеров Е.В., Христолюбова Е.И. Сравнительная эффективность разных вариантов антибактериальной терапии хронической бронхолегочной инфекции // Материалы учредительной конференции Всероссийского общества пульмонологов «Острые и хронические заболевания органов дыхания»– Рязань, 1986.– С. 62-64.
9. Штейнгардт Ю.Н., Букреева Е.Б., Агеева Т.С., Христолюбова Е.И. Диагностическое значение разных критериев этиологической диагностики пневмоний и обострения хронического бронхита // В кн.: Вопросы распространенности, диагностики и лечения НЗЛ в Дальневосточном районе.– Благовещенск, 1985.–С. 122.
10. Букреева Е.Б., Русакова Е.В., Алексеенкова Л.И. Значение возбудителя болезни легионеров в этиологии обострений хронического бронхита / Советская медицина.–1987.–№12.– С.23-24.
11. Штейнгардт Ю.Н., Букреева Е.Б., Христолюбова Е.И., Русакова Е.В., Алексеенкова Л.И. Этиологическая структура обострений хронического бронхита / Терапевтический архив. –1988.–№11.–С. 93-95.
12. Агеева Т.С., Букреева Е.Б. Роль *H. influenzae* в этиологии неспецифических процессов в легких и ее клиническое значение // В сб.: Современные методы диагностики и лечения НЗЛ.– Материалы заседания

- секции проблемной комиссии союзного значения «Пульмонология», Омск, 1990.–С. 78.
13. Букреева Е.Б., Агеева Т.С. Эндобронхиальная суперинфекция у больных неспецифическими воспалительными заболеваниями легких // Материалы I Всесоюзного конгресса по болезням органов дыхания. Киев, 1990.–№ 960
 14. Букреева Е.Б., Агеева Т.С. Гемофильная инфекция при неспецифических воспалительных заболеваниях легких / Клиническая медицина.–1990.– №10.– С.130-133.
 15. Букреева Е.Б. Взаимосвязь обострений эндобронхита, бронхиальной бактериальной инфекции и клиники обострений хронического бронхита // Материалы IV Национального конгресса по болезням органов дыхания. Москва, 1994.– №1060.
 16. Букреева Е.Б., Немеров Е.В. Соотношение клинических и бактериологических эффектов эндобронхиальной терапии хронического бронхита // Материалы V Национального конгресса по болезням органов дыхания. Москва, 1995.–№ 1099.
 17. Христюлова Е.И., Мишустина Е.Л., Букреева Е.Б. Особенности иммунологических показателей больных ХБ в зависимости от этиологии обострения // Материалы VI Национального конгресса по болезням органов дыхания. Новосибирск, 1996.–№ 575.
 18. Агеева Т.С., Букреева Е.Б. Внутрибольничная эндобронхиальная суперинфекция у больных неспецифическими воспалительными заболеваниями легких // Актуальные вопросы военной медицины.- Материалы юбилейной конференции, посвященной 200-летию Российской Военно-медицинской академии.- Томск.- 1999.–С. 324-336.
 19. Волкова Л.И., Букреева Е.Б., Боярко В.В., Польща Н.Г. Опыт применения эреспала при обострении ХБ / Клиническая фармакология и терапия.- 2000.-№ 5.- С.65-66.
 20. Букреева Е.Б., Мельник Т.Г., Березко И.В. Диагностические ошибки в пульмонологическом стационаре // Материалы 10 Национального конгресса по болезням органов дыхания.- С.-Петербург.- 1-4 ноября 2000.– №376.–С.103.
 21. Волкова Л.И., Букреева Е.Б., Польща Н.Г., Биттнер И.А., Будкова А.А., Черемисина О.В. Тонзан в комплексной терапии обострений хронического бронхита // Материалы VII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». - Москва, 2001.– С. 125.
 22. Букреева Е.Б., Дементьева Е.А., Нестерович С.В., Швецова Н.М., Мельник Т.Г. Влияние эреспала на миелопероксидазу нейтрофилов крови и мокроты у больных хроническим обструктивным бронхитом // Материалы 11 Национального конгресса по болезням органов дыхания. - 2001. – 9-13 ноября, Москва.– С. 296.

23. Волкова Л.И., Букреева Е.Б., Боярко В.В., Польша Н.Г., Геренг Е.А. Эффективность эреспала при обострении хронического бронхита // Материалы VIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 2001, С. 126-127.
24. Букреева Е.Б., Мельник Т.Г., Дементьева Е.А., Нестерович С.В., Березко И.В. Эффективность эреспала при обострении хронического обструктивного бронхита // Материалы IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – Москва, 2002.- С. 70.
25. Букреева Е.Б., Мельник Т.Г., Гудкова Л.В., Дементьева Е.А., Нестерович С.В. Роль внутриклеточных возбудителей в этиологии обострений хронического бронхита // Материалы IV Российской конференции «Современные проблемы антимикробной химиотерапии». – 2002. - 8-11 октября Москва. – С.14.
26. Букреева Е.Б., Дементьева Е.А., Нестерович С.В., Мельник Т.Г., Березко И.В. Противовоспалительная эффективность эреспала и атровента при обострении хронического обструктивного бронхита / Материалы 12 Национального конгресса по болезням органов дыхания. – 2002. – 11-15 ноября, Москва. – С. 25
27. Букреева Е.Б., Акбашева О.Е., Суханова Г.А., Дементьева Е.А., Нестерович С.В., Мельник Т.Г., Гудкова Л.В., Иванчук И.И. Активность эластазы и её ингибиторов при разной этиологии обострения у больных ХОБ // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – Приложение №1. – 2002. – С. 55-57.
28. Акбашева О.Е., Суханова Г.А., Букреева Е.Б., Дементьева Е.А. Роль ингибиторов протеолиза при заболеваниях бронхолегочной системы // Материалы IV съезда физиологов Сибири – Новосибирск, 2002, С. 8-9.
29. Сеитова Г.Н., Букреева Е.Б. Гены-кандидаты хронического обструктивного бронхита // Сборник «Генетика человека и патология», выпуск 6 – Томск, 2002, С.189-191.
30. Черногорюк Г.Э., Букреева Е.Б., Ламброва В.Г. Эозинофилия в генезе воспалительных заболеваний бронхолегочной системы на фоне хронического описторхоза // Сборник трудов международной конференции: “Медико-биологические и экологические проблемы здоровья человека на Севере.”- Сургут., 2002-С. 235-238.
31. Сеитова Г.Н., Богушевич С.А., Букреева Е.Б., Дементьева Е.А., Нестерович С.В. Клинико-генеалогическое исследование больных ХОБЛ / Бюллетень сибирской медицины.–2002.–№4.–С.38-40
32. Букреева Е.Б., Дементьева Е.А., Мельник Т.Г., Нестерович С.В. Влияние курения на бронхиальное дерево у здоровых // Сборник «Актуальные вопросы медицинского обеспечения войск, подготовки и усовершенствования военно-медицинских кадров».– Вып.8.–Томск, 2003, С.87-88.

33. Букреева Е.Б., Мельник Т.Г., Дементьева Е.А., Гудкова Л.В., Акбашева О.Е. Инфекция и колонизация при хронической обструктивной болезни легких // Материалы V Российской конференции “Современные проблемы антимикробной химиотерапии” – Москва, 2003, С. 40
34. Букреева Е.Б., Мельник Т.Г., Дементьева Е.А., Нестерович С.В, Сеитова Г.Н. Биохимические маркёры при инфекционной и неинфекционной этиологии обострения ХОБЛ // Материалы 13-го Национального конгресса по болезням органов дыхания.– СПб, 2003.– С.323
35. Букреева Е.Б., Мельник Т.Г., Дементьева Е.А., Нестерович С.В, Сеитова Г.Н., Акбашева О.Е. Биохимическая оценка эффективности лечения ХОБЛ // Материалы 13-го Национального конгресса по болезням органов дыхания.– СПб., 2003.–С.17
36. Букреева Е.Б., Сеитова Г.Н., Богушевич С.А., Дементьева Е.А., Нестерович С.В, Черногорюк Г.Э., Буйкин С.В. Экзогенные и эндогенные факторы в формировании ХОБЛ / Бюллетень сибирской медицины.– 2003.–№1.–С.75-77
37. Сеитова Г.Н., Букреева Е.Б., Косьянкова Т.В., Дементьева Е.А., Нестерович С.В., Пузырев В.П. Полиморфизм генов TNF α и NOS3 у больных ХОБЛ // Материалы XIII Нац. Конгресса по болезням органов дыхания.– С.-Пб., 10-14 ноября 2003г.–С.339.
38. Волкова Л.И., Букреева Е.Б., Боярко В.В., Польша Н.Г., Дементьева Е.А., Нестерович С.В., Акбашева О.Е. Характеристика клеточного и биохимического профиля индуцированной мокроты и крови у курящих и некурящих здоровых людей // Пульмонология.– 2004.–№2.–С.78-82.
39. Букреева Е.Б., Нестерович С.В., Дементьева Е.А., Плешко Р.И., Акбашева О.Е., Суханова Г.А., Мельник Т.Г., Сеитова Г.Н., Березко И.В. Применение эреспала у больных хронической обструктивной болезнью легких // Пульмонология.– 2004.–№2.–С.102-108.
40. Сеитова Г.Н., Букреева Е.Б., Буйкин С.В., Бычкова О.Ю., Дементьева Е.А., Нестерович С.В., Пузырев В.П. Роль полиморфизма в промоторной области гена TNF в развитии хронической обструктивной болезни легких // Бюл. сиб. медицины.–2004.–№2.–С. 29-33.
41. Сеитова Г.Н., Бычкова О.Ю., Букреева Е.Б., Пузырев В.П. Роль полиморфизмов генов конституционных синтаз оксида азота в развитии хронической обструктивной болезни легких // Генетика человека и патология: Сб. науч. тр.– 2004.–Вып. 8 (Принята в печать).
42. Bukreeva E.B., Nesterovich S.V., Dementjeva E.A., Melnik T.G., Gudkova L.V., Gereng E.A., Ivanchuk I.I. Induced sputum cytology at different etiology of exacerbation of chronic obstructive bronchitis / Eur. Respir. J.: Abstracts. – 12 th Annual Congress. Stockholm, Sweden. – September 14-18, 2002. – Vol. 20.– Suppl. 38.– P.3365, S. 543.
43. Bukreeva E.B., Dementjeva E.A., Nesterovich S.W., Seitova G.N., Akbasheva O.E., Schevtcova N.M., Gudcova L.V. Exacerbation aetiology and

- inflammation markers in chronic obstructive bronchitis / Eur.Respir.J. :Abstracts.ERS. Annual Congress. Stockholm, Sweden.–2002.–Vol.20.– Suppl. 38.–P.1625, S.252
44. Bukreeva E.B., Nesterovish S.W., Pleschko R.J., Dementjeva E. A., Melnik T.G., Seitova G.N. Bronchial brush-biopsies cytograms in different etiology of COPD exacerbation / Eur.Respir.J. :Abstracts. ERS. Annual Congress. Vienna.– 2003.– P. 2897, S.457.
 45. Bukreeva E.B., Dementjeva E.A., Nesterovish S.W., Akbasheva O.E., Seitova G.N. Proteolytic activity of sputum and serum in patients with COPD exacerbation in dependence on smoking / Eur. Respir. J.: Abstracts. ERS. Annual Congress. Vienna, -2003.–P.2676, S. 416.
 46. Seitova G.N., Kosyankova T.V., Bukreeva E.B., Dementjeva E.A., Nesterovish S.W., Puzyrev V.P. VNTR polymorphism MOS 3gene among Chronic Obstructive Pulmonary Disease patients / Eur. Respir. J.: Abstracts. ERS. Annual Congress. Vienna.– 2003.– P.2541, S. 392.
 47. Bukreeva E.B., Dementjeve E.A., Nesterovish S.W., Akbasheva O.E., Seitova G.N. Influence of infection and α 1-proteinase inhibitor on inflammatory response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease exacerbation / Eur. Respir. J.: Abstracts. ERS. Annual Congress. Vienna.– 2003.– P.2680, S.417.
 48. Bukreeva E.B., Nesterovish S.W., Melnik T.G., Gudkova L.V., Seitova G.N. Infection and bronchial obstruction in Chronic Obstructive Disease exacerbation / Eur. Respir. J.: Abstracts. ERS. Annual Congress. Vienna.– 2003.– P. 2682, S. 417.
 49. Buikin S.W., Seitova G.N., Bukreeva E.B., Dementjeva E.A., Nesterovish S.W. S and Z alleles of PJ gene among Chronic Obstructive lung disease patients and their relatives / European Society of Human genetics, Birmingham, England, 2003.– P. 115
 50. Bukreeva E.B., Nesterovish S.W., Pleshko R.J., Dementjeva E.A., Melnik T.G., Seitova G.N. The character of infections process in Chronic Obstructive pulmonary disease exacerbation / European Congress of Clinical Microbiology and Infections Diseases.-Abstracts, ERS. Annual. Congress.- Glasgow.– 2003.– P.1119
 51. Bukreeva E.B., Nesterovich S.V., Shilov B.V., Seitova G.N., Gudkova L.V. Induced sputum cell count at different infectious etiology of COPD exacerbation / 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Praha, 2004.
 52. Shilov B.V., Bukreeva E.B., Shilova N.V., Nesterovich S.V. The chromatin organization changing under influences of combination of chronic obstructive pulmonary disease with smoking, forming procancerogenic microenvironment // The 2004 Miami Nature Biotechnology Winter Symposium ‘The Cell Cycle, Chromosome and Cancer’.–2004.– Vol. 15.– №3.– P. 48-49.
 53. Seitova G.N., Bukreeva E.B., Nesterovich S.V., Dementjeva E.A. No association of Interleukin – 8 gene polymorphism and COPD in Russian and

- Siberian Tatars // Eur. Respir. J.: Abstracts. 14th ERS. Annual Congress. Glasgow.–2004.– Vol.24.–Suppl. 48.–P.2014.
54. Seitova G.N., Bukreeva E.B., Nesterovich S.V., Dementjeva E.A. Polymorphism of NRAMP1 gene in chronic obstructive pulmonary disease patients // Eur. Respir. J.: Abstracts. 14th ERS. Annual Congress. Glasgow.–2004.– Vol.24.–Suppl. 48.–P.2012.
 55. Seitova G.N., Bukreeva E.B., Nesterovich S.V., Dementjeva E.A. The role of 774C/T, -691C/T and 894G/T polymorphisms of NOS3 gene in development of COPD // Eur. Respir. J.: Abstracts. 14th ERS. Annual Congress. Glasgow.–2004.– Vol.24.–Suppl. 48.–P.2013.
 56. Bukreeva E.B., Nesterovich S.V., Shilov B.V., Pleshko R.I., Melnik T.G., Seitova G.N. Infection influence on induced sputum cell count at smokers and nonsmokers with COPD exacerbation // Eur. Respir. J.: Abstracts. 14th ERS. Annual Congress. Glasgow.–2004. – Vol.24.–Suppl. 48.–P.2528.
 57. Nesterovich S.V., Bukreeva E.B., Shilov B.V., Pleshko R.I., Seitova G.N. Cells composition of bronchial brush-biopsies in dependence on infectious agent species at COPD exacerbation // Eur. Respir. J.: Abstracts. 14th ERS. Annual Congress. Glasgow.–2004.– Vol.24.–Suppl. 48.–P.2519.
 58. Bukreeva E.B., Shilov B.V., Nesterovich S.V., Dementjeva E.A., Sukhanova G.A., Seitova G.N., Akbasheva O.E. Type of infection and inflammatory activity at COPD // Eur. Respir. J.: Abstracts. 14th ERS. Annual Congress. Glasgow.–2004.– Vol.24.–Suppl. 48.–P.2527.
 59. Nesterovich S.V., Bukreeva E.B. Bronchial biopsies composition in smokers and nonsmokers in COPD exacerbation // Eur. Respir. J.: Abstracts. 14th ERS. Annual Congress. Glasgow.–2004. – Vol.24.–Suppl. 48.–P.2535.
 60. Nesterovich S.V., Bukreeva E.B., Pleshko R.I. Characteristics of bronchial brush-biopsies at different etiology of COPD exacerbation // Eur. Respir. J.: Abstracts. 14th ERS. Annual Congress. Glasgow.–2004.– Vol.24.–Suppl. 48.–P.2530.
 61. Волкова Л.И., Букреева Е.Б., Польща Н.Г. Способ лечения хронического бронхита. Патент №2206332, Бюл. №17. 20.06.2003.
 62. Черемисина О.В., Волкова Л.И., Букреева Е.Б., Биттнер И.А. Способ лечения диспластических изменений бронхиального эпителия I степени у больных неспецифическими заболеваниями легких. Патент на изобретение №2217183, Бюл. №33. 27.11.2003.

Список сокращений

ХОБЛ	хроническая обструктивная болезнь легких
α_1 ПИ	α_1 – протеиназный ингибитор
α_2 МГ	α_2 – макроглобулин
КСИ	кислотостабильные ингибиторы
ТПП	трипсиноподобные протеиназы
ТПА	трипсиноподобная активность
МПО	миелопероксидаза
СЦК	средний цитохимический коэффициент
ИМ	индуцированная мокрота
ПСВ	пиковая скорость выдоха
МОС	максимальная объемная скорость
МЭЛФ	межэпителиальные лимфоциты
МЭЭФ	межэпителиальные эозинофилы
НФ	нейтрофилы
ЭФ	эозинофилы
ЛФ	лимфоциты
МФ	макрофаги
И+	инфекционное обострение
И-	неинфекционное обострение
К+	курящие больные
К-	некурящие больные
ОФВ ₁	объем форсированного выдоха за 1 секунду
ФНО	фактор некроза опухолей
ИЛ	интерлейкин
Ген NRAMP1	ген макрофагального белка 1, ассоциированный с естественной резистентностью