

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**Кремис Иван Сергеевич**

**ФАКТОРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К РАЗВИТИЮ ХРОНИЧЕСКОЙ  
ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ  
ВОЗДЕЙСТВИИ ТАБАЧНОГО ДЫМА**

14.01.25 – пульмонология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Диссертация**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

**Букреева Екатерина Борисовна**

доктор медицинских наук, профессор

**Геренг Елена Андреевна**

Томск – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |    |
|---|----|
| Список сокращений .....   | 5  |
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 7  |
| Глава 1. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПОРАЖЕНИЯ<br>ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ<br>ТАБАЧНОГО ДЫМА В РАМКАХ РАЗВИТИЯ ХОБЛ (Обзор литературы)                                    | 14 |
| 1. Роль адаптационно-защитных механизмов при постоянном воздействии<br>табачного дыма в реализации структурно-функциональных изменений СОБ<br>при хронической обструктивной болезни легких..... | 15 |
| 1.1. Морфология бронхиальной стенки в норме.....  | 15 |
| 1.2. Современная клинико-эпидемиологическая характеристика ХОБЛ<br>и роль табакокурения как этиологического фактора в формировании<br>заболевания. ....   | 16 |
| 1.3. Морфометрическая и морфофункциональная характеристика<br>слизистой оболочки бронхов у «здоровых» курильщиков и при ХОБЛ.....   | 18 |
| 1.4. Морфологическая и ультраструктурная характеристика слизистой<br>оболочки бронхов у «здоровых» курильщиков и при ХОБЛ. ....   | 22 |
| 2. Иммунологические и биохимические маркеры развития ХОБЛ.....  | 26 |
| 2.1. Иммунологические аспекты воспаления при ХОБЛ.....  | 26 |
| 2.2. Биохимические маркеры развития ХОБЛ .....  | 37 |
| 3. Современные представления о факторах резистентности к развитию<br>ХОБЛ.....  | 43 |
| 3.1. Роль стресса эндоплазматической сети в развитии ХОБЛ.....  | 43 |
| 3.2. Роль митохондриальной дисфункции в развитии ХОБЛ.....  | 44 |
| 4. Резюме .....   | 46 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....  | 48 |
| 2.1. Организация исследования .....   | 48 |
| 2.2. Клиническое обследование .....   | 49 |
| 2.3. Клинико-функциональная характеристика больных, включенных в<br>исследование.....   | 50 |

|  |    |
|--|----|
| 2.4. Методы исследования.....  | 53 |
| 2.4.1. Исследование вентиляционной функции легких (спирометрия). .   | 54 |
| 2.4.2. Исследование цитологического состава бронхиальных смывов .  | 54 |
| 2.4.3. Цитологическое исследование индуцированной мокроты.....   | 55 |
| 2.4.4 Морфологическое исследование бронхобиоптатов (слизистой<br>оболочки бронхов) .....   | 56 |
| 2.4.4.1. Гистологические методы исследования .....   | 57 |
| 2.4.4.2 Морфометрическое исследование.....   | 58 |
| 2.4.4.3 Методы электронно-микроскопического исследования.....  | 58 |
| 2.4.5. Биохимический анализ бронхиальных смывов и индуцированной<br>мокроты .....  | 59 |
| 2.4.6 Иммунологическая оценка показателей бронхиальных смывов и<br>индуцированной мокроты .....                                      | 61 |
| 2.4.7. Статистическая обработка результатов .....  | 61 |
| 2.4.8. Дизайн исследования.....  | 62 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....  | 64 |
| 3.1. Клинико-функциональная характеристика пациентов, включенных в<br>исследование.....  | 64 |
| 3.1.1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в<br>исследование.....   | 64 |
| 3.1.2. Результаты лабораторного обследования курильщиков.<br>Некоторые биохимические маркеры крови.....                              | 65 |
| 3.2. Биохимический анализ индуцированной мокроты и бронхиальных<br>смывов в группе сравнения и при ХОБЛ.....                         | 66 |
| 3.3. Клеточные маркеры в бронхиальном содержимом у лиц группы<br>сравнения и при хронической обструктивной болезни легких .....      | 69 |
| 3.3.1. Цитологическое исследование индуцированной мокроты в группе<br>сравнения и при хронической обструктивной болезни легких. .... | 69 |
| 3.3.2. Цитологическое исследование бронхиальных смывов в группе<br>сравнения и при ХОБЛ. ....  | 70 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.4. Тканевые, клеточные и молекулярные факторы развития хронической обструктивной болезни легких .....  | 74  |
| 3.4.1. Бронхоскопическое исследование слизистой оболочки бронхов у курильщиков без клинических признаков ХОБЛ и у пациентов с ХОБЛ .....   | 75  |
| 3.4.1.1. Морфофункциональные особенности бронхобиоптатов у курильщиков без клинических признаков ХОБЛ.....   | 75  |
| 3.4.1.2. Морфологическая характеристика слизистой оболочки бронхов у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких .....   | 88  |
| 3.4.2 Морфометрическая характеристика слизистой оболочки бронхов у «здоровых» курильщиков и больных ХОБЛ.....  | 103 |
| 3.4.3 Морфологическая и функциональная характеристика клеточного состава воспалительного инфильтрата бронхов у «здоровых» курильщиков и при ХОБЛ.....  | 106 |
| 3.4.4 Ультраструктурная характеристика бронхиального эпителия и сосудов собственной пластинки слизистой оболочки бронхов у «здоровых» курильщиков и при хронической обструктивной болезнью легких..... | 111 |
| 3.4.5 Иммунологические маркеры в бронхиальном содержимом у «здоровых» курильщиков и у курильщиков с ХОБЛ.....  | 117 |
| 3.4.6. Сравнительный внутригрупповой анализ пациентов с ХОБЛ в отношении основных маркеров формирования заболевания.....   | 119 |
| 3.5. Корреляционный анализ клинико-функциональных тестов, морфологических, иммунологических и биохимических параметров в слизистой оболочке бронхов в группе «здоровых» курильщиков и при ХОБЛ .....   | 122 |
| Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....  | 130 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 148 |
| ВЫВОДЫ.....  | 150 |
| Практические рекомендации .....  | 152 |
| Список литературы .....  | 153 |

### Список сокращений

- БА – бронхиальная астма
- БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
- БД - бронходилататор
- БК – бокаловидные клетки
- БС – бронхиальные смывы
- БЭ – бокаловидный эпителиоцит
- БЭОС – бронхиальные эпителиоциты обычного строения
- БЭСД – бронхиальные эпителиоциты с признаками дистрофии
- ГБ – гипертоническая болезнь
- ЖЕЛ – жизненная емкость легких
- ИМ – индуцированная мокрота
- ЛДФ – линейная дискриминантная функция
- ЛФ – лимфоциты
- МПВ – микропиноцитозные везикулы
- МС – сосуды микроциркуляторного русла
- МФ – макрофаги
- НФ – нейтрофилы
- НЭ – нейтрофильная эластаза
- ОФВ<sub>1</sub> – объем форсированного выдоха за 1 секунду
- ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ – модифицированный индекс Тиффно
- ПЛ – плазматическая клетка
- РЭ – реснитчатый эпителиоцит
- СОБ – слизистая оболочка бронхов
- СЦК – средний цитохимический коэффициент
- ТК – тучные клетки
- УО – удельный объем
- ФЖЕЛ – форсированная ЖЕЛ
- ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
- ЭПС (ЭР) – эндоплазматическая сеть (эндоплазматический ретикулум)

ЭФ – эозинофилы

ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение

FGF – фактор роста фибробластов

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

Ig – иммуноглобулин

ИЛ (IL) – интерлейкин

ИНФ- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) – интерферон- $\gamma$

LT – лейкотриен

Nrf2 – транскрипционный фактор

TGF- $\beta_1$  – трансформирующий фактор роста  $\beta_1$

Th – Т-хелперы

TLR – Toll-like-рецептор

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$

ФНО-альфа – фактор некроза опухоли - альфа

Treg – CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Т-регуляторные клетки

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

$\alpha_1$ -ПИ –  $\alpha_1$ -протеиназный ингибитор

STAT - сигнальный белок и активатор транскрипции

TSLP - тимический стромальный лимфопоэтин

CXCR – рецептор хемокинов

CCL – хемокины подсемейства CC ( $\beta$ -хемокины)

UPR - «ответ на мисфолдинг» (unfolded protein response)

## ВВЕДЕНИЕ

### АКТУАЛЬНОСТЬ РАБОТЫ

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) - широко распространенное неуклонно прогрессирующее заболевание бронхо-легочной системы, которое приводит к существенному снижению качества жизни, обуславливает раннюю инвалидизацию и высокую смертность больных [17]. В последние годы отмечается неуклонный рост данной патологии с поражением наиболее трудоспособной части населения в возрасте от 30 до 40 лет. По данным Всемирной организации здравоохранения во всем мире страдают ХОБЛ приблизительно 600 млн. человек, а в 2020 г. их число удвоится и будет занимать 3 место среди других болезней [126]. По заключению ЦНИИ организации и информатизации здравоохранения Министерства здравоохранения РФ, за период с 2005 до 2012 г., заболеваемость ХОБЛ в Российской Федерации увеличилась на 27% и составила 668,4 на 100 тыс. населения [13].

ХОБЛ является мультифакториальным заболеванием, в основе патогенеза которого лежат как сложные тканевые, клеточные и молекулярные взаимодействия в организме, так и взаимосвязь генетических факторов с условиями внешней среды [17, 89, 125].

На сегодняшний день курение табака является наиболее важным экзогенным фактором риска развития ХОБЛ. Рост заболеваемости и смертности у больных ХОБЛ связывают с увеличением распространенности курения. Было доказано, что хронический бронхит имеет место практически у каждого курильщика, но ХОБЛ развивается только у 50% курящих лиц [126]. Данный факт указывает на наличие у каждого конкретного индивидуума определенных наследственных факторов, модифицирующих влияние курения. Возможно, у лиц с определенным генотипом, пролонгированное воздействие такого агрессивного фактора, как табачный дым, приводит к срыву взаимоотношений между функционально ведущей тканью и стромой, что сопровождается развитием патологического процесса в бронхиальной стенке. В этой связи, поиск тканевых, клеточный и молекулярных маркеров предрасположенности к формированию

ХОБЛ, а также изучение особенностей состояния бронхиального дерева у курящих людей является важной задачей современной пульмонологии.

### **СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ**

В настоящее время ведется активное исследование этиологии, патогенеза, патоморфологии бронхолегочных заболеваний, в частности ХОБЛ. Большая часть работ направлена на исследование морфофункциональных, иммунологических и биохимических характеристик слизистой оболочки бронхов у курильщиков с ХОБЛ - детальное изучение реакции слизистой оболочки бронхов на длительное воздействие табачного дыма. В большинстве современных исследований изучались курильщики, лица, прекратившие курить и не курящие люди, без патологии органов дыхания и лишь небольшое количество работ посвящено комплексному сравнительному анализу курильщиков с ХОБЛ и курильщиков, резистентных к развитию данного заболевания. Наиболее современные и актуальные исследования причин резистентности слизистой оболочки бронхов к развитию ХОБЛ у курильщиков свидетельствуют о ключевой роли макрофагов, дендритных клеток, лимфоцитов в дыхательных путях, а также митохондриальной дисфункции и стресса эндоплазматической сети (ЭПС) в частности эффективности механизма «ответа на мисфолдинг» (unfolded protein response, UPR), наблюдаемое в эпителиальных клетках бронхиальной стенки [92, 94, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 120, 121, 122, 123, 124]. В настоящее время нет целостного представления о морфо-функциональных механизмах резистентности бронхиальной стенки к развитию ХОБЛ у курильщиков, что свидетельствует об актуальности исследований в этой области.

### **ЦЕЛЬ РАБОТЫ**

Цель диссертационной работы – установить тканевые, клеточные и молекулярные механизмы резистентности слизистой оболочки бронхов к развитию ХОБЛ у курильщиков

### **ЗАДАЧИ**

1. Оценить морфофункциональное состояние слизистой оболочки бронхов у курильщиков, страдающих и не страдающих ХОБЛ.



2. Выявить ультраструктурные особенности слизистой оболочки бронхов у курильщиков, страдающих и не страдающих ХОБЛ.

3. Изучить биохимические, цитологические и иммунологические показатели бронхиального секрета (индуцированная мокрота и бронхиальные смывы) у курильщиков, страдающих и не страдающих ХОБЛ.

4. На основе оценки тканевых, клеточных и молекулярных параметров слизистой оболочки бронхов установить факторы устойчивости компонентов бронхиальной стенки к развитию ХОБЛ при длительном воздействии табачного дыма.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА**

На основании гистологического, электронно-микроскопического, иммунологического, биохимического исследования впервые выявлены тканевые, клеточные и молекулярные маркёры резистентности слизистой оболочки бронхов (СОБ) к формированию морфофункциональных изменений бронхиальной стенки при длительном воздействии табачного дыма у курильщиков. Проведен комплексный анализ структурной архитектоники бронхиальной стенки у курильщиков с ХОБЛ и без нее.

Впервые установлены структурные и функциональные особенности собственной пластинки СОБ у курильщиков без клинических признаков ХОБЛ, отражающие реакцию дыхательных путей на воздействие табачного дыма. В данной группе были обнаружены морфофункциональные изменения, которые на электронно-микроскопическом уровне проявлялись в гиперплазии и гиперфункции белок-синтетического и энергетического аппарата в эпителиоцитах и повышении числа микропиноцитозных везикул и цитоплазматических выростов в эндотелиоцитах сосудов бронхов.

У курильщиков с ХОБЛ впервые дана комплексная характеристика состояния СОБ, что выражалось в значительной структурной дезорганизации эпителиального пласта с преобладанием дистрофических процессов над воспалительными изменениями, с ультраструктурными признаками регенераторно-пластической недостаточности в бронхиальных эпителиоцитах

(деградация цитоплазматического матрикса, расширение и вакуолизация гранулярной ЭПС, уплотнение митохондриального матрикса, набухание митохондриальных крист), а также морфологические признаки капилляротрофического дефицита в эндотелиоцитах сосудов бронхов.

Получены новые знания, основанные на данных морфологического исследования, подтверждающие развитие стресса ЭПС, нарушения функционирования сложного гомеостатического механизма, известного как «ответ на мисфолдинг» (unfolded protein response, UPR), а также митохондриальной дисфункции в клетках бронхиального эпителия при длительном воздействии табачного дыма, ассоциированном с ХОБЛ.

### **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ**

В ходе проведенной работы получены новые знания фундаментального характера, раскрывающие особенности реакции СОБ на длительное воздействие табачного дыма с развитием ХОБЛ и без развития данного заболевания. У пациентов с ХОБЛ в СОБ выявлены ключевые морфофункциональные маркеры прогрессирования заболевания: удельный объем (УО) базальных эпителиоцитов и покровного эпителия, УО ЭПС в бокаловидных и базальных эпителиоцитах.

Определен ряд цитологических (количество макрофагов, нейтрофилов и бронхиального эпителия с признаками дистрофии), иммунологических и биохимических показателей (определение концентрации интерлейкина-8,10, фактора некроза опухоли альфа, трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ , активности эластазы и  $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора) при исследовании бронхиальных смывов (БС) и индуцированной мокроты (ИМ) как предикторов развития ХОБЛ. Взаимосвязи данных показателей с другими важными морфологическими и клинико-функциональными параметрами (ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ, индекс курения, длительность синдрома одышки, частота обострения заболевания), позволяют использовать исследуемые маркеры в ИМ и БС при скрининговой диагностике ХОБЛ и формировании групп высокого риска развития заболевания. Анализ групп высокого риска позволит реализовывать

эффективные превентивные профилактические мероприятия и, возможно, разработать таргетные методы патогенетической терапии ХОБЛ.

## **МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Дизайн исследования и набор используемых в работе методов позволяет получить достоверную информацию о структурных особенностях слизистой оболочки бронхов у курильщиков, взаимосвязи ряда морфологических, иммунологических маркеров с ключевыми клинико-функциональными тестами, а также установить факторы резистентности к развитию ХОБЛ. В работе использован комплекс современных клинико-функциональных, морфологических, морфометрических, электронно-микроскопических, биохимических, статистических методов исследования. Многогранность методик исследования, использованных в работе, обеспечивает получение достоверной информации об особенностях и характеристиках реакции СОБ на длительное воздействие табачного дыма.

## **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ**

1. У курильщиков без ХОБЛ сохранялось типичное строение слизистой оболочки бронхов при минимальных воспалительных и дистрофических изменениях в эпителиоцитах на фоне гиперплазии бокаловидных клеток и белково-слизистых желез бронхов.

2. У курильщиков с ХОБЛ выявлены морфофункциональные признаки ремоделирования бронхиальной стенки с развитием нарушений транскапиллярного обмена, эндотелиальной дисфункцией и истощением структурно-метаболических резервов эпителиальных клеток бронхов.

3. При длительной экспозиции табачного дыма маркерами резистентности слизистой оболочки бронхов к развитию ХОБЛ на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях являются: сохранение нормальных показателей объемной плотности покровного эпителия; увеличение количества макрофагов при отсутствии значимого увеличения количества нейтрофилов на фоне сохранения нормальных концентраций TNF- $\alpha$ , ИЛ-8 в бронхиальных смывах и

индуцированной мокроте; сохранение нормальной объемной плотности ЭПС и митохондрий в эпителиальных клетках при увеличении удельного объема микропиноцитозных везикул в эндотелиоцитах капилляров бронхиальной стенки.

### **СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АППРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Высокая степень достоверности полученных результатов обеспечивается использованием комплекса современных и фундаментальных методик, достаточным, с точки зрения принципов доказательной медицины, объемом клинического материала (115 пациентов) и разносторонними подходами к статистическому анализу количественных данных.

Основные положения диссертации доложены и представлены на XI международном конгрессе «Здоровье и образование XXI века» (Москва, 2010); международной конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010); III Эмбриональном симпозиуме Международной ассоциации морфологов «Югра-Эмбрио-2011» «Закономерности эмбриофетальных морфогенезов у человека и позвоночных животных» (Ханты-Мансийск, 2011) ; IX, X, XII, XIV конгрессах Международной ассоциации морфологов (Бухара, 2008; Ярославль, 2010; Тюмень 2014; Астрахань, 2018); в рамках сессии постерных докладов на Европейском респираторном конгрессе в Амстердаме (2015) и Лондоне (2016).

По теме диссертации опубликовано 11 полнотекстовых статей в журналах из перечня ВАК РФ.

Диссертация изложена на 180 страницах машинописного текста, иллюстрирована 47 рисунками и 25 таблицами, содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы. Список использованной литературы содержит 268 источников, из них 56 отечественных и 212 иностранных.

### **ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА**

Автором диссертации проанализировал научную литературу по теме работы, принимал непосредственное участие в разработке идеи и дизайна

исследования, проводил отбор, клиническое обследование и курирование пациентов, забор и цитологическое, морфологическое, морфометрическое, биохимическое исследования биологического материала со статистическим анализом полученных данных. Под руководством научных руководителей написал все главы диссертации, автореферат, сформулировал концепцию работы и выводы, подготовил публикации по результатам исследования.

Таким образом, автор принимал непосредственное участие во всех этапах научно-исследовательской работы от проектирования до статистического анализа, обсуждения и публикации результатов исследования.

## **Глава 1. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПОРАЖЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ТАБАЧНОГО ДЫМА В РАМКАХ РАЗВИТИЯ ХОБЛ (Обзор литературы)**

В данной главе представлен обзор литературы по тканевым, клеточным и молекулярным маркерам, а также биохимическим мишеням, приводящих к ремоделированию бронхиального дерева – важной патоморфологической основы развития ХОБЛ при длительном воздействии табачного дыма, а также проведен обзор современных представлений о механизмах резистентности бронхиальной стенки к формированию данного недуга.

Последние годы отличались активным исследованием этиологии, патогенеза, патоморфологии бронхолегочных заболеваний, в частности ХОБЛ. Интерес к этим проблемам был связан не только с увеличивающейся распространенностью и утяжелением течения, ростом смертности от ХОБЛ, но и с учреждением Всемирной организацией здравоохранения «Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики» этого недуга (GOLD) [125, 126]. Кроме того, по данным последних эпидемиологических наблюдений ХОБЛ развивается только у 50 % курильщиков, что позволяет предположить лишь триггерное воздействие табачного дыма, а ключевая роль принадлежит эндогенным факторам в реализации данного недуга.

Выявление и уточнение тканевых, клеточных и молекулярных механизмов является актуальным направлением научных исследований, нацеленных на создание высокоинформативных концепций и эффективных схем диагностики, контроля и лечения ХОБЛ.

# **1. Роль адаптационно-защитных механизмов при постоянном воздействии табачного дыма в реализации структурно-функциональных изменений СОБ при хронической обструктивной болезни легких**

## **1.1. Морфология бронхиальной стенки в норме**

Бронхиальная стенка независимо от размера бронхов образована слизистой, подслизистой, волокнисто-хрящевой и адвентициальными оболочками. В бронхобиоптатах возможно идентифицировать только слизистую и подслизистую оболочки бронхов.

*Слизистая оболочка бронхов (СОБ)* включает в себя эпителий, собственную пластинку и мышечную пластинку.

Эпителий – однослойный многорядный призматический реснитчатый, располагается на базальной мембране. В его составе определяются низкие и высокие вставочные клетки, бокаловидные, реснитчатые, а также эндокриноциты, которые идентифицируются, преимущественно, в дистальных отделах бронхиального дерева.

Камбиальными элементами служат базальные эпителиоциты, которые имеют мелкие размеры, узкий «ободок» цитоплазмы, содержащей небольшое количество органоидов общего назначения, крупное ядро. Дифференцированными клетками являются реснитчатые и бокаловидные эпителиоциты (их соотношение в норме 4:1). Реснитчатые эпителиоциты имеют цилиндрическую форму, в их базальной части располагается ядро с сетчатой и мелкодисперсной структурой хроматина, в апикальной части расположены реснички типичного строения (около 250 штук), а также большое количество митохондрий. Клетки реснитчатого эпителия соединяются, преимущественно, десмосомами.

Бокаловидные экзокриноциты (клетки) – это внутриэпителиальные одноклеточные железы со слизеобразующей функцией, в расширенной апикальной зоне которых располагается слизистый секрет в форме плотноупакованных везикул. Слизь перемещается по поверхности эпителия благодаря биению ресничек бронхиальных эпителиоцитов.

Среди эпителиоцитов очень редко можно идентифицировать нейроэндокринные клетки в количестве 2–3 на 1000 клеток, поэтому в бронхобиоптатах здоровых лиц их обнаружить практически невозможно.

Собственная пластинка СОБ представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с большим количеством эластических волокон и немногочисленными гладкими миоцитами. В составе клеточного инфильтрата собственной пластинки СОБ выявляются макрофаги (МФ), плазматические клетки и лимфоциты (ЛФ).

Мышечная пластинка СОБ образована гладкомышечными клетками, формирующими плотные пучки мышечных волокон.

*Подслизистая оболочка* представлена рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью. В данной оболочке обнаруживаются концевые отделы белково-слизистых желез, эпителиальная выстилка которых представлена серозными и слизистыми glanduloцитами. В подслизистой оболочке определяются артериолы, венулы и капилляры, которые в совокупности формируют микроциркуляторное русло [2, 3, 4].

## **1.2. Современная клинико-эпидемиологическая характеристика ХОБЛ и роль табакокурения как этиологического фактора в формировании заболевания.**

ХОБЛ характеризуется неуклонно нарастающей бронхиальной обструкцией, связанной с гиперергической воспалительной реакцией в дыхательных путях на ингаляцию патогенных газов и частиц, приводящей к снижению скорости воздушного потока и сопровождающейся вторичной трансформацией ацинуса [5, 6, 7, 8, 9, 11].

Распространенность ХОБЛ продолжает расти, несмотря на современные подходы к терапии, с увеличением заболеваемости среди молодого трудоспособного населения [16]. В России данным недугом страдает около 24 млн. человек по результатам анализа статистических данных, что составляет 10–15 % от общей популяции населения [10, 14].



Мужчины в большей степени подвержены ХОБЛ, что подтверждается проведенными исследованиями [1, 11, 12, 13, 16]. В настоящее время появляются научные работы о более высокой распространенности исследуемой нозологии среди лиц женского пола, чем мужского, что, вероятно, связано с высокой степенью табачной зависимости женщин. Показано, что для женщин характерно более быстрое прогрессирование клинико-функциональных показателей с формированием тяжелой стадии ХОБЛ, что обусловлено как особенностями метаболизма табака в дыхательных путях, так и со структурно-функциональными характеристиками последними [15, 16]. Морфологическая основа тяжелого течения заболевания у женщин связана с меньшим диаметром бронхов, уменьшенным клиренсом и усиленной ответной воспалительной реакции на токсические и инфекционные агенты, увеличением осаждения этих молекул в бронхо-легочной системе [15].

Установлено, что у лиц женского пола происходит нарушение экспрессии цитохрома P450 (основного катализатора окисления ксенобиотиков) под воздействием эстрогенов. В результате этого у женщин нарушается метаболизм никотина и нарастает содержание основных оксидантов, которые реализуют оксидативный стресс в дыхательных путях. Этот фактор нередко является определяющим патофизиологическим механизмом развития структурно-функциональных изменений, которые формируются в СОБ при ХОБЛ [18, 19].

В отличие от других бронхо-легочных заболеваний воспаление при ХОБЛ развивается, одновременно, в воздухоносных путях, паренхиме легких, а также сосудах. Клеточные и молекулярные маркеры воспалительных реакций при ХОБЛ могут изменяться в процессе развития и утяжеления заболевания и приобретать ключевое значение в ремоделировании дыхательной системы.

Ведущим этиологическим фактором развития ХОБЛ является воздействие табачного дыма. В последних исследованиях пристальное внимание отводится длительности курения в сочетании с генетическим полиморфизмом генов, кодирующих АВО группу,  $\alpha_1$ -антитрипсин, витамин D-связывающий белок,  $\alpha_2$ -макроглобулин, цитохром P-450A<sub>1</sub> [10, 20, 21]. В отличие от некурящих

пациентов, у курильщиков с ХОБЛ повышена частота развития респираторных симптомов, более выражены: снижение вентиляционной функции легких, интенсивность воспаления, окислительного стресса и нарушений протеиназно-антипротеиназной системы [1, 6, 32, 48, 126]. В то же время установлено, что только у 50% всех курильщиков развивается ХОБЛ [105, 126]. Риск развития заболевания выше у курящих лиц на фоне наследственной отягощенности и составляет до 95 % [22, 23].

В последнее десятилетие активно изучаются универсальные механизмы «реакции» клетки в неблагоприятных условиях, в том числе при длительном воздействии табачного дыма [96, 107, 108].

Показана роль некоторых транскрипционных факторов, а также адаптационные способности белок-синтетических и энергетических систем клетки к стрессовым ситуациям, таким, например, как табачная зависимость. Вместе с тем, до сих пор не изучены структурные и функциональные изменения СОБ у курильщиков с ХОБЛ [93, 94, 97, 109, 112].

### **1.3. Морфометрическая и морфофункциональная характеристика слизистой оболочки бронхов у «здоровых» курильщиков и при ХОБЛ.**

Данные литературы о значении конкретных клеточных и молекулярных факторов, вызывающих изменение структурной организации дыхательной системы у больных ХОБЛ, развивающегося на фоне курения и без него немногочисленны, как и данных в отношении факторов, определяющих устойчивость СОБ к развитию заболевания.

В литературе оценивались морфофункциональные особенности СОБ у исследуемых объектов с ХОБЛ и «здоровых» курильщиков как в бронхиальных смывах, так и в бронхобиоптатах.

В жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) у курильщиков с ХОБЛ определяется значительное увеличение количества нейтрофилов и концентрации нейтрофильной эластазы (НЭ) по сравнению с некурящими лицами. В общем, число нейтрофилов (НФ), макрофагов (МФ), лимфоцитов (ЛФ) у пациентов с выраженной клиникой ХОБЛ и длительным воздействием табачного дыма в 10

раз больше, чем у «здоровых» курильщиков. Следует отметить, что аналогичная картина определялась в цитограмме БАЛ у пациентов с ХОБЛ, прекративших курение. В ряде исследований было показано, что у некурящих пациентов с ХОБЛ продолжается персистенция воспаления, но ремоделирование бронхиальной стенки не определяется [89, 127, 128]. Уменьшение содержания нейтрофилов в БАЛ у пациентов с ХОБЛ, бросивших курить также свидетельствует о снижении воспаления в бронхиальной стенке, однако полного восстановления структуры бронхов не происходит в связи с тем, что роль хемоаттрактантов в данном случае принимают продукты разрушения эластина и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса [20, 21, 32, 36, 129, 130].

Значительная миграция нейтрофилов в область воспаления может быть связана не только с хемотаксисом под действием разных факторов, синтезируемых МФ, фибробластами, эпителиальными и дендритными клетками, но и со способностью самих НФ продуцировать интерлейкин-8 (ИЛ-8), LTB<sub>4</sub>, которые мобилизуют в очаг другие гранулоциты с дальнейшей хронизацией воспаления в СОБ [24, 25, 40, 90].

Установлено, что повышенное количество оксидантов у курильщиков с ХОБЛ вызывает изменение структурной организации актина нейтрофилов и понижает их миграционную способность. Данные изменения способствуют «застреванию» НФ в микроциркуляторном русле легких и усиливают их адгезии к эндотелиальным клеткам. Кроме того, данный процесс характеризуется генерацией большого количества активных форм кислорода, что способствует миграции нейтрофильных гранулоцитов через увеличенные межэндотелиальные пространства [136].

Значительное скопление активированных нейтрофилов в капиллярах альвеол приводит к оксидативному стрессу, под действием которого происходит разрушение их структурных элементов с последующим развитием эмфиземы [41].

При ХОБЛ наблюдается снижение переваривающей способности НФ на фоне роста их хемотаксической и фагоцитарной активности [42, 43].

В настоящее время, недостаточно изучена роль тучных клеток (ТК) и эозинофилов (ЭФ) в морфологических изменениях бронхиальной стенки при постоянном воздействии табачного дыма, ассоциированном с развитием ХОБЛ [132]. Timens W. et al. Обнаружили, что на стадии ремиссии ХОБЛ происходит увеличение МФ и Т-лимфоцитов в собственной пластинке СОБ при неизменном количестве НФ, ЭФ, ТК. Наличие немногочисленных гранулированных ЭФ в бронхобиоптатах курильщиков с ХОБЛ является признаком тяжелого течения болезни и опосредованно указывает на развитие эмфиземы легких [37, 38, 39]. Эозинофильную инфильтрацию проксимальных отделов воздухоносных путей можно обнаружить у больных во время обострений, вызванных вирусной инфекцией, а также при бронхитическом варианте ХОБЛ [89]. Данные D'Armiento J.M. et al. указывают на обратную корреляционную зависимость между концентрацией эозинофильного эотаксина-1 в плазме крови и бронхиальных смывах и стабильным течением ХОБЛ с редкими обострениями и слабым прогрессированием заболевания [39].

Работы Grashoff et al. показали значительное повышение числа интраэпителиальных ТК у пациентов с ХОБЛ, что не исключает их роль в патогенезе развивающихся патоморфологических нарушений, приводящих к бронхиальной обструкции [131].

В последние годы, большое внимание уделяется изучению роли дендритных клеток в патогенезе ХОБЛ. Установлено, что стимуляция сигаретным дымом этих клеточных популяций у мышей нарушает их морфофункциональное состояние. Важно отметить, что количество дендритных клеток и их функциональная активность в ткани легкого отличается у «здоровых» курильщиков и пациентов с ХОБЛ [114, 133, 134]. Tsoumakidou M et al было показано статистически значимое снижение количества зрелых дендритных клеток у пациентов с ХОБЛ по сравнению со «здоровыми» курильщиками, а у последних по сравнению с лицами никогда не принимавшими никотин. Полученные данные указывают на возможную значимую роль дендритных клеток в иммунопатогенезе развития ХОБЛ [135].

Неоднозначные данные накоплены в отношении фагоцитарной способности альвеолярных МФ в бронхиальном секрете: ряд авторов сообщают об ее угнетении [2, 3], другие авторы – о повышении на стадии ремиссии ХОБЛ и снижении при обострении заболевания [44, 45, 46, 47].

Следует отметить, что на стадии обострения ХОБЛ увеличивается число МФ с незавершенным фагоцитозом, что свидетельствует об угнетении активности кислородзависимой бактерицидной системы [24, 42, 47]. Дефект фагоцитоза, при ХОБЛ положительно коррелирует с тяжестью заболевания и является одним из его патогенетических звеньев.

Установлено, что альвеолярные МФ курильщиков спонтанно выделяют увеличенное количество  $H_2O_2$ , что связывают с усилением оксидативного стресса и ростом интенсивности их активации. Клеточные культуры макрофагов периферической крови курящих лиц, вырабатывают в 2 раза больше  $O_2^-$ , чем у некурящих [2, 24, 32, 33, 34, 35]. Кроме того, в результате воздействия табачного дыма у больных ХОБЛ происходит стойкое изменение функциональной активности данных клеточных популяций с резким преобладанием провоспалительного фенотипа [113].

Литературные данные указывают на ведущую роль нейтрофилов, макрофагов и  $CD8^+$ -лимфоцитов при ХОБЛ [110]. Общее их количество в составе клеточного инфильтрата увеличивается не только в собственной пластинке СОБ, но и внутри эпителиального пласта, что часто сопровождается ремоделированием бронхиального дерева [6, 28, 35, 37, 48, 49, 50, 51]. В различных клинических условиях преобладают гетерогенные воспалительные фенотипы Т-лимфоцитов ( $CD8^+$ -клетки и др.), которые с активированными нейтрофилами начинают доминировать при утяжелении ХОБЛ [95]. У курильщиков с ХОБЛ в БАЛ увеличивается количество  $CD4^+CD25^+$ регуляторных Т-лимфоцитов, которые активизируют преобразование  $CD8^+CD45R0$  («нативных» цитотоксических Т-лимфоцитов) в  $CD8^+CD45RA$  (цитотоксические Т-лимфоциты памяти). Последние аккумулируются в СОБ и способны к реализации цитотоксических свойств по

отношению к эпителиоцитам дыхательных путей даже в стадии клинической ремиссии болезни [52, 53].

Установлено, что при эмфизематозном фенотипе ХОБЛ, по сравнению с бронхитическим и смешанным вариантами, в дыхательных путях преобладают  $CD4^+CD25^+$ регуляторные Т-лимфоциты. Преобладание данной популяции лимфоцитов в СОБ при ХОБЛ свидетельствует о высокой степени активации супрессорного пути регуляции иммунного ответа [111].

Роль цитотоксических ЛФ ( $CD8^+NK$ ) в развитии и патоморфологии ХОБЛ обсуждается и требует дальнейшего исследования. Ряд ученых указывают, на то, что цитотоксические факторы, выделяющиеся из  $CD8^+NK$ , способны вызвать окислительные процессы в ДНК эпителиальных клеток, индуцирует развитие в них мутаций, что нарушает формирование десмосом и разрушает целостность эпителиального пласта, что может служить основой начального ремоделирования бронхиального дерева [37, 52, 54, 55].

В ряде исследований, были получены интересные данные в отношении влияния интерлейкина-2 на пролиферацию и активацию  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -лимфоцитов. Повышенный уровень данного цитокина в сыворотке крови коррелирует со стабильным течением ХОБЛ и медленным прогрессированием заболевания, что связано с активацией клеточного иммунитета и более эффективной противoinфекционной защитой [39].

#### **1.4. Морфологическая и ультраструктурная характеристика слизистой оболочки бронхов у «здоровых» курильщиков и при ХОБЛ.**

В настоящее время в литературе практически не встречаются исследования по сравнительной морфологической и ультраструктурной характеристике СОБ пациентов с ХОБЛ и «здоровых курильщиков», что подчеркивает актуальность исследований в данном направлении.

У курильщиков с ХОБЛ дисбаланс в системе протеаз-антипротеаз, окислительный стресс, а также персистирующий воспалительный процесс сочетаются с нарушениями архитектоники бронхиальной стенки, которые, по данным Непомнящих Г.И. и соавт., имеют диффузный характер и протекают по

двум типовым вариантам [2, 3, 84]. Пролиферативно-клеточный вариант связан с формированием воспаления в СОБ, дегенеративно-клеточный реализуется в дистрофически-атрофическом процессе в бронхиальной стенке. При этом пролиферативно-клеточный вариант сопровождается развитием хронической катаральной формы бронхита, дегенеративно-клеточный приводит к хронической фиброзирующей и атрофической бронхопатии [2].

На светооптическом уровне в большем количестве наблюдений при ХОБЛ отмечены участки метаплазии и гиперплазии бронхиального эпителия, преимущественно диффузная, полиморфноклеточная инфильтрация, признаки эндотелиальной дисфункции и хронического нарушения гемодинамики, фиброз собственной пластинки СОБ.

Ряд авторов указывают, что при ХОБЛ в СОБ определяется снижение метаболической на фоне роста пролиферативной активности базальных эпителиоцитов с развитием плоскоклеточной метаплазии [85, 115, 116]. В ходе исследований было показано, что механизмы развития данных структурных изменений в бронхиальной стенке реализуются посредством активации нейтрофильной эластазы, повышенной экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), а также усиленного высвобождения провоспалительных цитокинов, особенно фактора некроза опухоли–альфа (TNF- $\alpha$ ), ИЛ-1, ИЛ-6 [117, 118, 119].

Для пролиферативно-клеточного варианта на ультраструктурном уровне исследования биоптатов бронхов характерно наличие признаков альтерации отдельных реснитчатых эпителиоцитов при сохранении нормального строения многорядного цилиндрического эпителия. В клетках реснитчатого эпителия наблюдается неправильное расположение ресничек, изменение угла наклона их к клеточной поверхности, появление атипичных ресничек с количественно измененным комплексом фибрилл. На апикальной поверхности реснитчатых эпителиоцитов образуются цитоплазматические выросты, в цитоплазме видны крупные пузырьки, формирующиеся в результате вакуолизации и расширения ЭПС, частично разрушенные органеллы и очаги деструкции. Увеличивается число

бокаловидных экзокриноцитов, встречаются немногочисленные эпителиоциты с дистрофическими и дегенеративными изменениями. Авторадиографическое исследование указывает на увеличение белок-синтетической активности при данном варианте как в эпителиоцитах, так и в клетках собственной пластинки СОБ [3, 85, 86].

Дегенеративно-клеточный вариант реализуется в доминировании атрофических изменений эпителия бронхов, ассоциированных с диффузным фиброзом собственной пластинки СОБ.

На светооптическом уровне исследования выявляется уплощение покровного эпителия со снижением многорядности эпителиоцитов, единичные бокаловидные экзокриноциты с признаками гипосекреции. Пучки коллагеновых волокон слизистой оболочки утолщены, встречаются очаги гиалиноза; мышечные пучки в состоянии атрофии и фиброза. Атрофия железистого эпителия сопровождается его уплощением и образованием кист желез.

При ультраструктурном исследовании бронхобиоптатов у пациентов с ХОБЛ в зависимости от тяжести процесса в СОБ может определяться как пролиферативно-клеточный, так и дегенеративно-клеточный вариант структурной перестройки. В бронхобиоптатах могут обнаруживаться значительные повреждения реснитчатого аппарата с заменой утраченных ресничек цитоподиями и микроворсинками различной формы.

Многие авторы указывают на значительное расширение межклеточных пространств, нарушение контактов между клетками, набухание митохондрий с частичной или полной деструкцией крист. При развитии атрофии эпителиоциты СОБ уменьшаются в размере, приобретают уплощенную форму, темную электронно-плотную цитоплазму, а цитоплазматические органеллы становятся трудно дифференцируемыми. Бокаловидные экзокриноциты чаще всего размещаются небольшими группами и переполнены крупными электронно-светлыми гранулами. Для данных клеток характерна гиперплазия пластинчатого комплекса Гольджи, гранулярной ЭПС, рибосом [85].



Резкое снижение белок-синтезирующей функции бронхиальных эпителиоцитов в сочетании со снижением уровня биосинтетических процессов в клетках подлежащей стромы подтверждается результатами радиоавтографического анализа синтеза РНК в клеточных популяциях СОБ у пациентов с атрофической бронхопатией [2, 86].

При формировании дегенеративно-клеточного варианта изменений архитектоники стенки бронхов у курильщиков с ХОБЛ возможно развитие эпителиально-мезенхимальной дисфункции, отражающееся в активизации процессов фиброобразования.

При ШИК-окрашивании ткани установлено, что первичное утолщение базальной мембраны при ХОБЛ взаимосвязано с гиалинозом, приводящим к ее пропитыванию белками плазмы крови. Важно отметить, что его выраженность положительно коррелировала с плотностью воспалительного инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки [3, 32, 54, 88].

Необратимое деформирование просвета бронхов и увеличение их сопротивления связаны с усиленным развитием соединительной ткани в бронхиальной стенке, что сопровождается фиброзом базальной мембраны. Процесс фиброза при ХОБЛ регулируется факторами роста фибробластов (FGF-1, FGF-2), которые в бронхиальной стенке продуцируются макрофагами, нейтрофилами и эпителиоцитами [137, 142]. При этом в последние годы были полученные данные о роли FGF-7 и FGF-10 в формировании повышенной чувствительности к развитию ХОБЛ [138 - 141].

Развитие фиброза приводит к уменьшению эластичности бронхиальной стенки и содействует формированию необратимой обструкции. При ХОБЛ развивается сужение просвета дистального отдела бронхиального дерева на 80 % в сравнении с данным параметром у здоровых лиц [24, 44, 51, 86].

Изменения сосудов при ХОБЛ имеют неспецифический характер и развиваются при прогрессировании болезни и переходе ее в тяжелую форму. В собственной пластинке СОБ количество кровеносных сосудов уменьшено,

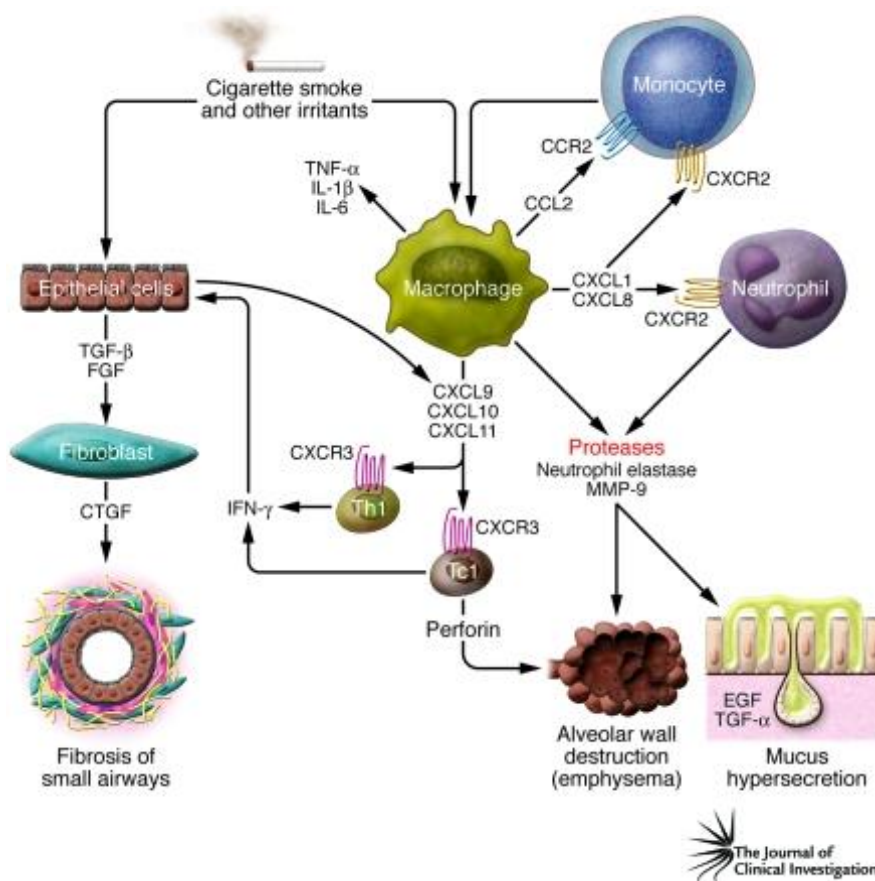
средняя оболочка утолщена, также определялся периваскулярный фиброз, нередко сочетающийся с очагами ангиоматоза [2, 3, 24, 44, 86].

По данным литературы имеются немногочисленные исследования в области нарушения функционирования нервного аппарата бронхиальной стенки при развитии ХОБЛ. Ряд исследователей описывают разрастание сателлитов, дистрофию клеток интрамуральных узлов и диффузный фиброз [8].

## **2. Иммунологические и биохимические маркеры развития ХОБЛ**

### **2.1 Иммунологические аспекты воспаления при ХОБЛ**

Цитокины играют ключевую роль в организации хронического воспаления при ХОБЛ путем привлечения, активации, и кооперации клеток в дыхательных путях (рис. 1). В настоящее время известно, что более 50 цитокинов вовлечены в хроническое воспаление при ХОБЛ. Однако роль ряда цитокинов в патофизиологии этого сложного заболевания дыхательных путей до сих пор остается неясной. Цитокины классифицируются на лимфокины (цитокины, которые секретируются Т-клетками и регулируют иммунный ответ), провоспалительные цитокины (цитокины, которые усиливают и пролонгируют воспалительный процесс), факторы роста (цитокины, которые способствуют выживанию клеток и приводят к структурным изменениям в дыхательных путях), хемокины (цитокины, которые обеспечивают хемотаксис воспалительных клеток), и противовоспалительные цитокины (цитокины, которые отрицательно модулируют воспалительную реакцию). Следует отметить, что эффекты цитокинов могут потенцировать друг друга.



**Рисунок 1.** Цитокины, участвующие в патогенезе ХОБЛ (по данным Peter J. Barnes)

Ингаляционные раздражители, такие как сигаретный дым, активируют эпителиоциты и МФ, которые в свою очередь продуцируют цитокины, в том числе трансформирующий фактор роста  $\beta_1$  ( $TGF-\beta_1$ ) и фактор роста фибробластов (FGFs), стимулирующие пролиферацию фибробластов, приводящую к фиброзу и сужению просвета мелких бронхов. Эти клетки также секретируют провоспалительные цитокины - фактор некроза опухоли- $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ), интерлейкин- $1\beta$  (ИЛ- $1\beta$ ) и интерлейкин-6 (ИЛ-6), которые активизируют воспалительный процесс, и некоторые хемокины, которые привлекают циркулирующие клетки крови в бронхо-легочную систему. Важно отметить, что каждый цитокин действует через собственные рецепторы, привлекая в очаг воспаления другие клетки (так CXCL1 и CXCL8 действуют через CXCR2, привлекая нейтрофилы и моноциты, CXCL9, CXCL10 и CXCL11 действуют через CXCR3, привлекая Th1 клетки и Tc1 клетки CCR2 и т.д.). Гиперсекреция слизи стимулируется EGF и  $TGF-\alpha$ . CTGF, а также фактором роста соединительной ткани.

В настоящее время выделены 31 провоспалительный цитокин, основные и наиболее изученные из которых – фактор некроза опухоли - альфа (TNF- $\alpha$ ), интерферон, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-32 и стромальный лимфопоэтин тимуса (TSLP). Несколько хемокинов также оказывают прямое провоспалительное действие [144], однако нами будет рассмотрена роль CXCL8 (ИЛ-8), который традиционно рассматривается как цитокин. Среди факторов роста, мы рассмотрим роль семейства TGF- $\beta$  и других профибротических факторов роста с позиций опубликованных данных об их потенциальной роли в патогенезе ХОБЛ [151].

### **Отдельные цитокины, вовлеченные в патогенез ХОБЛ**

#### **ИЛ-1 (IL-1)**

Как ИЛ-1 $\alpha$ , так и ИЛ-1 $\beta$  связываются с одним ИЛ-1-рецептором (названный ИЛ-1R1), и являются провоспалительными цитокинами, продуцируемыми, главным образом, моноцитами, макрофагами и фибробластами. Антагонист ИЛ-1-рецептора (IL-1RN или IL-1RA) связывается с IL-1R и ингибирует связывание как ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ , нейтрализуя их активность и, таким образом, выступает в качестве эндогенного контррегулирующего механизма.

Количество клеток иммунореактивных для ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  увеличено в биоптатах бронхов у пациентов стабильным течением ХОБЛ по сравнению с контролем без ХОБЛ [183], хотя эти данные в отношении ИЛ-1 $\beta$  не подтверждены окончательно [185]. Моделирование ХОБЛ на животных показало противоречивые данные о роли инфламасома NLRP3 в течении индуцированного табачным дымом и ИЛ-1 $\beta$ -модулированного воспаления в бронхолегочной системе [186, 188, 189] Первоначально было предположено, что ИЛ-1 $\beta$  играет значимую роль в развитии индуцированных табачным дымом эмфиземе и перестройки дыхательных путей [188], но более поздние данные исследований на мышах свидетельствуют о инфламасом-независимой индукции ИЛ-1 $\beta$  в течении воспаления, индуцированного табачным дымом [186, 189]. Эти данные соответствуют недавнему клиническому испытанию, показавшему, что канакумаб (моноклональные нейтрализующие антитела ИЛ-1 $\beta$ ) был

неэффективным при лечении стабильной ХОБЛ [162]. Другие ИЛ-1 $\beta$  – блокирующие антитела (MEDI8986) в настоящее время проходит клинические испытания при ХОБЛ [44].

### **ИЛ-5**

ИЛ-5 продуцируется Th2-лимфоцитами и, как правило, связан с атопическим воспалением дыхательных путей. В тоже время, существуют литературные данные о том, что при обострении ХОБЛ Th2 вовлечены в патогенез болезни. Установлено, что при ремиссии концентрация ИЛ-5 в мокроте, жидкости БАЛ, количество Th2-лимфоцитов в слизистой оболочке бронхов, а также количество мРНК, кодирующая ИЛ-5 в бронхолегочной системе являются низким и не отличаются от группы контроля, а также от курящих и некурящих пациентов. Согласно данным литературы, стабильное течение ХОБЛ коррелирует со степенью эозинофилии и реакции на глюкокортикоиды, что позволяет предположить у этих субъектов синдром перекрёста астмы/ХОБЛ [192, 193].

Кроме того, растворимый ИЛ-5R $\alpha$  (это рецептор) увеличивается во время вирус-индуцированных обострений ХОБЛ, однако у пациентов с легкой и среднетяжелой ХОБЛ в период обострения заболевания, содержание ИЛ-4 и ИЛ-5 не изменялось по сравнению с группой пациентов со стабильным течением заболевания вне обострения [145, 146].

### **Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ)**

ГМ-КСФ высвобождается из клеток воспалительного инфильтрата и таким образом поступают в бронхолегочную систему. Провоспалительные цитокины, такие как TNF- $\alpha$ , ИЛ-17, и бактериальный липополисахарид могут индуцировать *in vitro* высвобождение ГМ-КСФ из клеточного инфильтрата. *In vitro* под воздействием экстракта сигаретного дыма уменьшается высвобождение ГМ-КСФ из культуры эпителиальных клеток бронхов.

В эксперименте установлено, что количество мРНК, кодирующее ГМ-КСФ при однократном воздействии сигаретного дыма снижается, а при длительном

воздействии сигаретного дыма происходит увеличение ГМ-КСФ в бронхолегочной системе [194, 195].

При сочетанном воздействии сигаретного дыма и липополисахарида на структуры слизистой оболочки бронхов и дальнейшее лечение таких пациентов нейтрализующими анти-ГМ-КСФ моноклональными антителами приводило к снижению количества макрофагов и нейтрофилов в БАЛ, а также многих провоспалительных медиаторов в бронхолегочной системе [196, 197]. В тоже время, стимуляция CD8<sup>+</sup>T-клеток, выделенных из легких пациентов со стабильной ХОБЛ с использованием анти-CD3-ε антител, активирующих T-клеточный рецептор, вызывала секрецию ГМ-КСФ [198]. В настоящее время, нет опубликованных исследований, сравнивающих клетки, продуцирующие ГМ-КСФ в бронхах у «здоровых» курильщиков и у курильщиков с ХОБЛ.

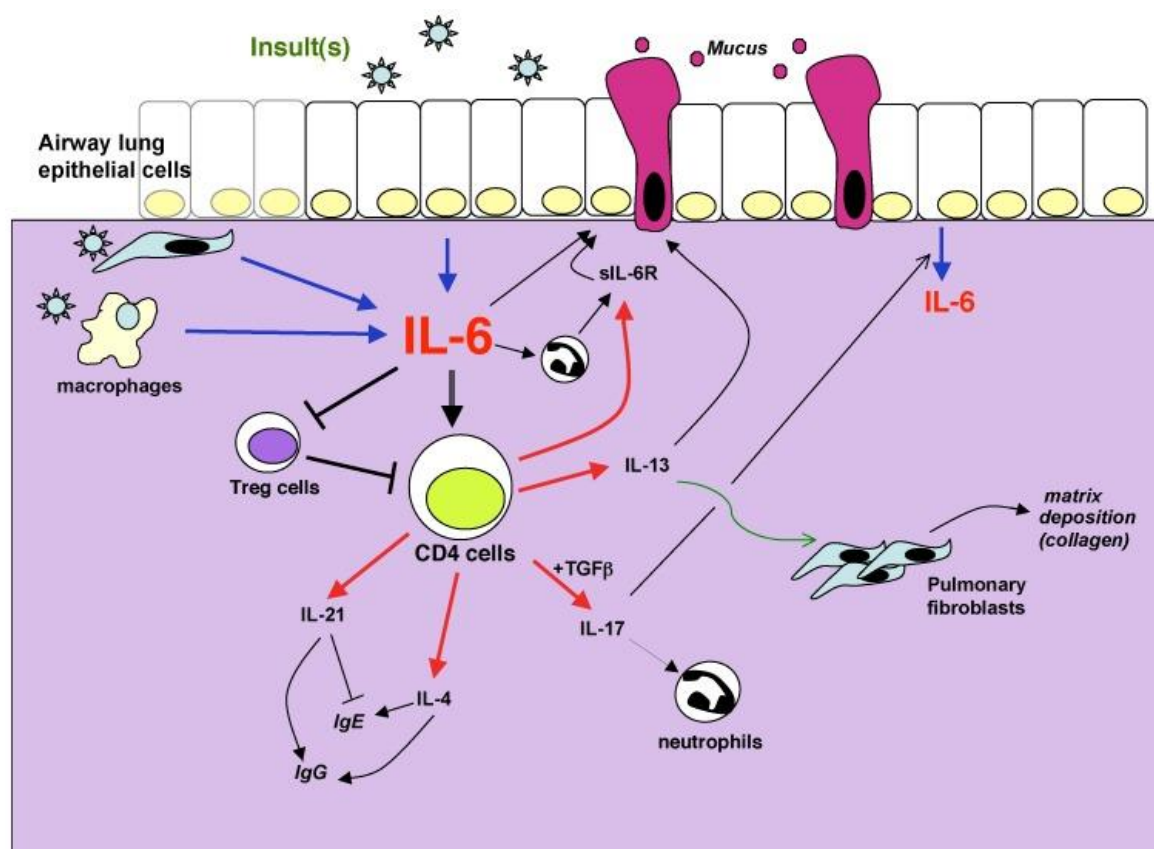
Важно отметить, что ГМ-КСФ в мокроте, но не в СОБ и легких, был увеличен у пациентов со стабильной ХОБЛ по сравнению с группой «здоровых» курильщиков в одних исследованиях [209] и снижался в других [210]. В литературе отсутствуют данные о взаимодействии антагонистов рецепторов ГМ-КСФ в СОБ у больных ХОБЛ.

### **ИЛ-6**

ИЛ-6 играет важную роль в прогрессировании ХОБЛ [147, 148, 199], (рис. 2). В ряде исследований было установлено, что концентрация ИЛ-6 в индуцированной мокроте больных ХОБЛ обратно коррелировала с ОФВ<sub>1</sub> [149, 150]. В последние годы при анализе маркеров воспаления у больных ХОБЛ показано, что именно по количеству ИЛ-6 в сыворотке крови, а не TNF-α и ИЛ-8 можно прогнозировать увеличение смертности при ХОБЛ [151,152]. Недавние исследования доказывают ассоциацию вариантов гена ИЛ-6 с ХОБЛ. По данным He JQ, Foreman MG et al. при исследовании больных ХОБЛ и курильщиков без ХОБЛ была показана связь между наиболее распространенными полиморфизмами гена ИЛ-6 (-174G/C SNP и 321G/T) и восприимчивостью к развитию ХОБЛ [152, 153, 154].

ИЛ-6 в бронхо-легочной системе продуцируется эпителиальными клетками, фибробластами, интерстициальными макрофагами и лимфоцитами. Производство ИЛ-6 индуцируется в ответ на множество стимулов, которые активизируют клеточный стресс и повреждение. Посредством ИЛ-6 возможна регуляция функциональной активности  $CD4^+$ T-клеток, в том числе продукцию ими цитокинов, активизация sIL-6R (растворимый рецептор к ИЛ-6), их цитотоксическую активность. В присутствии sIL-6R, ИЛ-6 может регулировать различные функциональные аспекты, а именно повреждение эпителиальных клеток, усиление продукции слизи, активация ростовых факторов.

Таким образом, вышеуказанные исследования показали, что ИЛ-6, вероятно, играет роль в патогенезе ХОБЛ путем модуляции функции клеток паренхимы и стромы бронхо-легочной системы. В тоже время, точный механизм влияния ИЛ-6 на функциональное состояние бронхопроводящей системы неизвестен и подвергается постоянной дискуссии.



**Рисунок 2.** Потенциальные механизмы, посредством которых ИЛ-6 (IL-6) может способствовать ремоделированию бронхов при заболеваниях органов дыхания (по данным Mercedes Rincon и Charles G. Irvin, 2012)

### **Тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP)**

TSLP - это цитокин семейства ИЛ-7, продуцируется преимущественно стромальными клетками, в том числе ТК, и принимает участие в активизации и выживании Т-лимфоцитов и дендритных клеток [201-204]. Продукция TSLP в эпителии дыхательных путей индуцируется через транскрипционный ядерный фактор-kB -зависимые пути [205, 206]. Его действие опосредовано через гетеродимерный рецептор, состоящей из ИЛ-7R $\alpha$  и TSLP рецептора (TSLPR).

In vitro экспрессия TSLP и TSLP-R в гладкомышечных клетках бронхов малого калибра увеличивается после хронического воздействия экстракта сигаретного дыма [207]. TSLP является посредником перекрестного взаимодействия между гладкомышечными и тучными клетками бронхов [176]. TSLP и TSLP-R-блокирующие антитела нейтрализуют повышенную сократительную активность гладкомышечных клеток дыхательных путей, индуцированных экстрактом сигаретного дыма, что подтверждает роль данного лимфокина в реализации обострения ХОБЛ [207]. TSLP также вовлечен в индукцию глюкокортикоидной резистентности в Th-клетках при воспалении дыхательных путей путём регулирования фосфорилирования сигнального белка и активатора транскрипции STAT5 [177]. TSLP может усиливать активацию макрофагов дыхательных путей и продукцию хемокинов [178].

По данным последних исследований было показано увеличение числа клеток, экспрессирующих TSLP мРНК в бронхах больных с ХОБЛ по сравнению с контрольной группой курильщиков без нарушения функции легких [179]. Повышенное содержание TSLP было выявлено в гладкомышечных клетках пациентов со стабильной формой ХОБЛ по сравнению с некурящими здоровыми исследуемыми [180]. Несмотря на то, что были разработаны блокирующие антитела к TSLP, в настоящее время нет конкретных данных о роли TSLP и его рецептора в механизмах развития ХОБЛ при курении [181].

### **ИЛ-8(CXCL8)**

TNF- $\alpha$  через транскрипционный ядерный фактор-kB активизирует ген ИЛ-8 с последующим увеличением выработки данного медиатора [96, 107, 108].



Установлено, что совместное действие этого интерлейкина с лейкотриеном В<sub>4</sub> формирует мощный селективный хемоаттрактантный эффект для НФ [8, 10, 24, 22, 25, 26, 27].

Концентрация ИЛ-8 заметно повышена в мокроте пациентов со стабильным течением ХОБЛ, и коррелирует с тяжестью болезни. Блокирующие антитела к CXCL8 и синергическим хемокинам ингибируют определенные типы нейтрофильного воспаления у экспериментальных животных. Нейтрализация CXCL8 блокирующими антителами значительно снижает хемотаксическую активность нейтрофилов мокроты пациентов со стабильным течением ХОБЛ. Однако этот эффект блокируется лишь частично, что указывает на значимую роль других нейтрофильных хемотаксических факторов, таких как лейкотриен В<sub>4</sub> и активированный фактор комплемента С5а. CXCL8 играет важную роль в хемотаксисе нейтрофилов, индуцируемом альвеолярными макрофагами, и это наиболее эффективно ингибируется двойным антагонизмом CXCR1 и CXCR2 рецепторов [182]. Установлено, что количество CXCL8 в мокроте значительно выше у α1-антитрипсин-дефицитных пациентов, чем у пациентов с ХОБЛ с нормальным уровнем α1-антитрипсина. Кроме того, наблюдается увеличение уровней CXCL8 в БАЛ пациентов, продолжающих курить, с эмфиземой легких и при стабильном течении ХОБЛ. По данным *Zhang X*, уровень CXCL8 в мокроте тяжелых больных ХОБЛ был повышен в 16,5 раз по сравнению со здоровыми добровольцами [157]. Существенное увеличение содержания CXCL8-белка наблюдается в слизистой оболочке бронхов больных с тяжелым течением ХОБЛ по сравнению с группой «здоровых» курильщиков [175]. Содержание CXCL8 мРНК белка увеличивается в 1,5 раза в бронхиальном эпителии у пациентов с ХОБЛ по сравнению с контрольной группой «здоровых» курильщиков [171]. Использование моноклональных антител к CXCL8 приводило к уменьшению одышки у пациентов с ХОБЛ, но не влияло на функции легких и результаты теста 6- минутной ходьбы [172]. Использование CXCR2 антагониста приводило к снижению нейтрофилов в мокроте пациентов со стабильной формой ХОБЛ, но не влияло на клиническое течение болезни [174, 173].

### **Фактор некроза опухоли - альфа (TNF- $\alpha$ )**

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что табачный дым активирует высвобождение TNF- $\alpha$  из макрофагов [27, 28, 29, 30, 31, 108].

TNF $\alpha$  является важным белком хемотаксиса для нейтрофилов: ингаляция TNF $\alpha$  индуцирует нейтрофилез мокроты и гиперреактивность дыхательных путей у здоровых добровольцев. *In vitro*, TNF $\alpha$  также индуцирует CCL13 (моноцитарный хемоаттрактантный протеин 4), хемокин с мощным эффектом хемотаксиса для эозинофилов, моноцитов, Т-лимфоцитов и базофилов. TNF $\alpha$  стимулирует функциональную активность эпителиальных, гладкомышечных, а также клеток бронхолегочной системы к высвобождению медиаторов воспаления. TNF $\alpha$  стимулирует гиперсекрецию слизи (увеличение секреции MUC5AC) бронхиальными эпителиальными клетками, повышает содержание молекул адгезии на воспалительных, эпителиальных и эндотелиальных клетках, облегчает миграцию воспалительных клеток в нижние дыхательные пути, и активирует профиброзные механизмы, участвующие в ремоделировании дыхательных путей [211, 212].

Важно отметить, что для больных ХОБЛ характерны не только повышенные уровни TNF $\alpha$  в крови и мокроте, но и значительно более высокие уровни растворимых рецепторов к TNF $\alpha$  - TNFR1 в мокроте и TNFR2 в крови. Установлено, что содержание рецепторов sTNF в мокроте, в отличие от данного показателя в крови, обратно пропорционально ОФВ<sub>1</sub> у пациентов с ХОБЛ. У больных ХОБЛ также была выявлена повышенная экспрессия гена данного цитокина в поперечно-полосатой мышечной ткани. Данный факт позволяет предположить, что мышечная кахексия является следствием повышенного высвобождения TNF $\alpha$  из эпителиальных и воспалительных клеток и повреждающее действие этого цитокина на поперечно-полосатую мышечную ткань.

Глюкокортикоиды, низкие дозы теофиллина, ингибиторы фосфодиэстеразы-4 и p38 митоген-активированной протеинкиназы значительно тормозят продукцию TNF $\alpha$  *in vitro* и/или *in vivo*. Селективные ингибиторы TNF $\alpha$

находятся в клинической разработке. Однако, несмотря на потенциальную клиническую значимость данной мишени терапии, в настоящее время, получены обратные результаты по применению инфликсимаба у пациентов с легкой или тяжелой ХОБЛ. Было выявлено положительное влияние на различные клинические параметры, в том числе частоту обострений, одышку и  $ОФВ_1$  [170], однако на этом фоне увеличилась заболеваемость пневмониями и частота малигнизации при ХОБЛ. Таким образом, системная блокада  $TNF\alpha$  может привести к повышенному риску инфекции, рецидиву туберкулеза, реактивация гепатита В, усугублению застойной сердечной недостаточности и повышению риска развития злокачественных новообразований. Предполагается, что анти- $TNF\alpha$  терапия может быть более перспективной для лечения обострений ХОБЛ, чем в качестве поддерживающей терапии [169].

### **Суперсемейство TGF $\beta$**

Суперсемейство TGF $\beta$  состоит из секретируемых факторов роста, участвующих в регуляции различных клеточных процессов, таких как клеточный рост, развитие, дифференцировка, пролиферация, подвижность, адгезию и апоптоз. Повышение уровня TGF $\beta_1$  зарегистрировано при ряде легочных заболеваний: ХОБЛ, бронхиальная астма, фиброз легких [184]. TGF $\beta_1$  избыточно экспрессируется в эпителии и макрофагах мелких дыхательных путей у пациентов с ХОБЛ, но до сих пор не известно, является ли это проявлением ХОБЛ или стимулирующим влиянием табачного дыма.

### **Интерфероны**

ИНФ- $\gamma$  является преобладающим цитокином, производимым Th1 и цитотоксическими Т-клетками 1 типа (Tc1) и может играть важную роль в процессе воспаления у лиц с ХОБЛ, инициируя высвобождение хемокинов. ИНФ- $\gamma$  активизирует фактор транскрипции T-bet (его название происходит от T-box expressed in T cells) посредством фактора транскрипции STAT1, в результате экспрессии генов, кодирующих Th1- цитокины и через подавление генов, кодирующих Th2 цитокинов [168]. ИНФ- $\gamma$  также регулирует инфильтрацию Th1 и Tc1 в легких у лиц с ХОБЛ через хемокиновый рецептор CXCR3 на этих клетках

и CXCR3-активацию хемокинов CCL9 (монокин, индуцируемый ИНФ- $\gamma$  - MIG), CCL10 (ИНФ- $\gamma$ -индуцибельный белок - IP-10) и CCL11 (I-TAC) [213]. В соответствии с этим, происходит увеличение количества Т-клеток, секретирующих ИНФ- $\gamma$  в дыхательных путях пациентов с ХОБЛ [166, 167, 168, 184].

#### *Тип I и Тип III ИНФ.*

Тип I ИНФ (ИНФ- $\alpha$  и ИНФ- $\beta$ ) и типа III ИНФ (ИНФ- $\lambda$ ) играют важную роль в формировании врожденного иммунитета против вирусных инфекций, однако в настоящее время роль данных интерферонов при ХОБЛ является малоизученной.

В последние годы идет активное изучение новых цитокинов, таких как ИЛ - 13, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-33. При этом особое значение уделяется изучению роли ИЛ-13 и ИЛ-17 в патогенезе ХОБЛ [158, 159, 164]. По данным Nakamura M ИЛ-13 наряду с ИЛ-5 и ИЛ-7 адаптируют организм к длительному воздействию табачного дыма [161]. ИЛ-17 выполняет защитную функцию в легочной ткани, и по данным исследований понижается при развитии ХОБЛ в несколько раз [158, 160, 163, 166].

#### **Противовоспалительные цитокины**

Хотя большинство цитокинов потенцируют или взаимодействуют друг с другом при воспалительном процессе при ХОБЛ, некоторые цитокины обладают ингибирующим или противовоспалительным действием. ИЛ-12, через высвобождение ИФН- $\gamma$  из Th1 клеток, может подавить высвобождение цитокинов Th2 клеток при атопическом воспалении. TGF- $\beta$  обладает иммуномодулирующим действием через супрессию CD4+ Т-клеток, однако терапевтическое использование данного цитокина затруднено в силу его профибротического действия [200]. ИЛ-10 обладает значительным противовоспалительным потенциалом: подавляет синтез воспалительных белков, в том числе некоторых цитокинов (например, TNF- $\alpha$ , ГМ-КСФ, ИЛ-5 и нескольких хемокинов), избыточно продуцируемых при ХОБЛ, а также ингибирует презентацию антигена макрофагами. ИЛ-10 производится множеством Т-регуляторных клеток и макрофагами [214]. ИЛ-10 также активен при ХОБЛ, так как он не только

тормозит выработку TNF- $\alpha$  и хемокинов, но и металлопротеиназу-9, которые могут быть вовлечены в разрушение легочной паренхимы. Установлено, что концентрация ИЛ-10 уменьшаются в мокроте больных ХОБЛ [151, 184].

Интересные данные были получены Калущкиным А.Г. и др. при исследовании концентрации ряда цитокинов в сыворотке крови у курящих и некурящих пациентов, страдающих ХОБЛ, а также у «здоровых» курильщиков и некурящих людей. Так, уровни ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-10 не отличались в исследуемых группах независимо от наличия заболевания и фактора курения. ИЛ-8 был достоверно выше в группе курящих пациентов с ХОБЛ, чем в других группах, в том числе достоверно выше чем в группе «здоровых» курильщиков. Уровни TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , напротив, были более высокие у пациентов ХОБЛ без фактора курения. В ходе исследования была показана прямая корреляционная связь данных интерлейкинов с частыми обострениями заболевания и низким качеством жизни пациентов с ХОБЛ, независимо от наличия фактора курения. На основании полученных данных можно предположить о значимой роли ИЛ-8, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в развитии и прогрессировании заболевания, а также в структурной перестройке бронхиального дерева. Важно отметить, что гендерных различий по цитокиновому профилю не было получено [143].

## 2.2 Биохимические маркеры развития ХОБЛ

Воспалительные реакции, наблюдаемые в дыхательных путях у пациентов с ХОБЛ, формируют нарушения в системе «протеазы-антипротеазы» и антиоксидантной защиты, что на фоне оксидативного стресса способствует прогрессированию заболевания [90]. Эти механизмы могут быть как наследственно детерминированными (генетический дефицит  $\alpha_1$ -антитрипсина), так и приобретенными (окислительные элементы сигаретного дыма, различные виды газов и т.д.) [5, 6, 8, 9, 49, 56].

Согласно данным литературы при развитии ХОБЛ реализуется многоуровневый каскад взаимодействий между оксидантами, антиоксидантами, фагоцитирующими клетками, нейтрофильной эластазой (НЭ), ингибиторами протеиназ, про- и противовоспалительными цитокинами. Большое количество

фактов, собранных за долгую историю исследования протеазно-антипротеазной системы, указывают на то, что дисбаланс в данной системе имеет доминантную роль при формировании ХОБЛ [5, 30, 32, 57, 58, 110].

Среди большого количества медиаторов, продуцируемых воспалительными клетками, НЭ имеет ключевое значение в разрушении коллагена III и IV типов, эластина, фибронектина, ламинина, гликопротеинов протеогликанов, и расстройстве нормальной архитектоники соединительной ткани [58, 59, 60, 61, 62].

НЭ – сериновая протеиназа, аккумулирующаяся в азурофильных цитоплазматических гранулах полиморфно-ядерных лейкоцитов, в основном в НФ. Во время роста гранулоцита происходит продукция данного фермента, а в кровотоке выходит клетка с функционально активной НЭ. Незначительные концентрации НЭ можно определить в моноцитах и Т-лимфоцитах. Молекулярная масса эластазы, выделенной из разных источников, варьирует в пределах 25000–33000 кДа, оптимум pH = 7,0 [6, 32].

В настоящее время, НЭ отводится значимая роль в регуляции воспалительного процесса, причем в зависимости от «микроокружения», концентрации и активности данный фермент может реализоваться как провоспалительный, и как противовоспалительный агент [32, 59, 60, 61, 62].

Интенсификация воспалительного процесса происходит за счет активизации продукции ИЛ-6, 8, ГМ-КСФ, деградации сурфактантного протеина А и  $\alpha_1$ -антитрипсина, расщепления эластина на хемоаттрактанты МФ и НФ [63, 96, 107].

Противовоспалительный эффект эластазы обусловлен повышением протеолитической активности в отношении ИЛ-1 $\beta$ , 2, расщеплением рецепторов липополисахарида CD8-14 и фосфатидилсериновых рецепторов МФ, деструкцией бактериальных эндотоксинов, ингибированием рецептора молекулы межклеточной адгезии 1 – CR3 [6, 32, 56, 64].

Участие НЭ в ремоделировании бронхов осуществляется через изменение функциональной активности белково-слизистых желез и морфологии реснитчатых эпителиоцитов [32, 65].

Выделение эластазы из НФ в межклеточное пространство происходит под действием различных факторов: цитокинов (TNF- $\alpha$ , ИЛ-8), липополисахаридов, фрагментов бактериальной стенки. Инактивация НЭ реализуется в большей степени  $\alpha_1$ -протеиназным ингибитором ( $\alpha_1$ -ПИ), а также  $\alpha_2$ -макроглобулином [60, 62, 66, 67].

Согласно данным Макинского А.И. и соавт. снижение функциональной активности фермента в дыхательных путях происходит за счет специфического ингибитора эластазы – элафина (elastase specific inhibitor), секреторного лейкоцитарного протеиназного ингибитора (SLPI), которые вырабатываются эндотелиоцитами, клетками Клара и пневмоцитами 2 типа [68]. Установлено, что концентрация эластазы в бронхиальном содержимом гораздо выше количества  $\alpha_1$ -ПИ в плазме и в СОБ. В этой связи, в бронхолегочной системе имеются более высокие потенции для реализации деструктивного потенциала НЭ даже на фоне нормальной концентрации ингибитора [69, 70]. При выраженных воспалительных процессах в бронхиальной стенке НЭ находится в бронхиальном дереве в свободном виде, в комплексе с эластином и ее ингибитором [6, 32, 60, 62].

По данным исследований Черногорюка Г. Э и соавт., у длительно курящих лиц без ХОБЛ дисбаланс в системе «протеиназы – антипротеиназы» представлен высокой активностью антипротеиназ –  $\alpha_1$ -ПИ и  $\alpha_2$ -МГ, что обеспечивает достаточную защиту тканей бронхолегочной системы от разрушительного воздействия протеиназ. При ХОБЛ в СОБ, напротив, констатировалась низкая активность антипротеиназной системы.

В этой связи, высокая активность  $\alpha_1$ -ПИ и  $\alpha_2$ -МГ в бронхиальном регионе у «здоровых» курильщиков можно рассматривать как один из факторов толерантности к развитию ХОБЛ [110, 112].

Несмотря на внушительные антипротеазные резервы, имеющиеся в любом организме, существуют механизмы, способствующие реализации эластазой своего разрушительного потенциала. Это происходит за счет создания «рабочего защищенного пространства» (ограниченное пространство, где происходит дегрануляция клеток), окисления активного центра фермента и т.д. [32, 58, 67, 70].

В литературе постоянно обсуждается вопрос об роли НЭ, ростовых факторов, матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в ремоделировании СОБ при ХОБЛ. Так, по данным Сагиндиковой Г.Е., матриксные металлопротеиназы-8, 9, являющиеся элементами НФ, МФ и эпителиоцитов СОБ, могут приводить к разрушению межальвеолярных перегородок, что является важным звеном патогенеза развития эмфиземы [71].

В современных исследованиях описывается доминантная роль матриксной металлопротеиназы-9 и ее тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 в процессах неоангиогенеза [8, 51, 72, 73, 74]. Эти данные подтверждаются результатами иммуногистохимических исследований, согласно которым выявлено одновременное увеличение функциональной активности тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 и  $TGF-\beta_1$  в МФ и эпителиоцитах у пациентов с эмфиземой легких, что сопровождалось активацией периваскулярного фиброза и неоваскулогенеза [32, 71].

Ряд авторов описывают факт, что важным этапом ремоделирования бронхиальной стенки является повреждение эндотелиоцитов и эпителиоцитов. Установлено, что эндотелиоциты микроциркуляторного русла подвергались лизису как после непосредственного воздействия НЭ, так и при сочетанном воздействии липополисахаридной стимуляции и данного фермента [32, 44, 75, 76].

Подавление функциональной активности эластазы происходит под влиянием  $\alpha_1$ -ПИ ( $\alpha_1$ -антитрипсин, серпин).  $\alpha_1$ -ПИ - это гликопротеин с молекулярной массой 55000, состоящий из 394 аминокислот и 3 карбогидратных цепочек. Он составляет 75% фракции  $\alpha_1$ -глобулинов сыворотки крови. Синтез  $\alpha_1$ -ПИ осуществляется шероховатым эндоплазматическим ретикуломом гепатоцитов в виде неактивного предшественника. В последние годы показано, что этот белок при воспалении также может продуцироваться моноцитами крови, альвеолярными макрофагами и эпителиоцитами бронхов [1, 24, 56].

Человеческий  $\alpha_1$ -ПИ существует, как минимум, в виде 20 различных изоформ. Самая распространенная изоформа (у 86–99 % населения) – это аллель



PiM с фенотипом PiMM [36]. Активный центр  $\alpha_1$ -ПИ представлен met358-ser359, функциональная активность связана с метионином, окисление последнего приводит к полной дезактивации фермента [78, 79].  $\alpha_1$ -ПИ имеет широкий спектр действия и снижает функционирование трипсина, химитрипсина, калликреина, НЭ, тромбина, активатора пламиногена, катепсина G, пламина, а также подавляет эстеразную и протеолитическую активность фактора Хагемана, акрозина, микробных сериновых протеиназ.

Самая высокая функциональная активность определяется у данного ингибитора в отношении эластазы нейтрофилов. Механизм действия  $\alpha_1$ -ПИ реализуется в образовании обратимых комплексов «фермент+ $\alpha_1$ -протеиназный ингибитор» [56, 67, 77]. В инактивации  $\alpha_1$ -ПИ принимают участие тиоловые протеиназы, коллагеназа, эластаза и металлопротеиназы НФ [80].

Низкая молекулярная масса позволяет  $\alpha_1$ -ПИ распределяться по сосудам и в периваскулярной зоне. Протеиназный ингибитор – это главным образом сывороточный белок, который попадает в легкие путем пассивной диффузии. Согласно данным исследований, эндотелий активно проницаем для  $\alpha_1$ -ПИ, в результате чего, концентрация его в интерстициальной ткани легких может достигать 80 % от его концентрации в плазме. С другой стороны, эпителий представляет собой относительно непроницаемый барьер для данного белка, поэтому в пристеночной слизи концентрация  $\alpha_1$ -ПИ до 10 раз меньше концентрации в плазме. Это позволяет быстро повышаться концентрации  $\alpha_1$ -ПИ в очаге воспаления за счет усиленного поступления его в поврежденные ткани, где происходит быстрое взаимодействие его с протеолитическими ферментами из поврежденных клеток, в результате чего функционирование данного ингибитора в патологии рассматривается как действие белка острой фазы [56, 78, 81].

С другой стороны, установлено, что при хроническом воспалительном процессе, определяющемся при ХОБЛ, увеличение концентрации  $\alpha_1$ -ПИ в СОБ происходит, в том числе, и за счет усиления его образования в МФ и эпителиальных клетках.

В настоящее время доказано, что важен не только количественный дефицит  $\alpha_1$ -ПИ, но и потеря его функциональной активности при сохранении нормальной концентрации. В главной причине нарушения функционирования  $\alpha_1$ -ПИ является окисление метионина (положение 351 и 358) в активном центре молекулы ингибитора, что связано с длительным воздействием оксидантов сигаретного дыма, а также с повышенным образованием пероксида водорода [79, 82].

Полученный из БАЛ курильщиков с тяжелой формой ХОБЛ  $\alpha_1$ -ПИ характеризуется пониженной эластазоингибирующей активностью, что стимулирует процессы протеолиза. Это развивается за счет действия окислителей, появляющихся в результате оксидативного стресса, которые преобразуют функционально активный ингибитор в неактивную форму [37, 41]. При этом считается, что доминантное значение в этой ситуации принадлежит миелопероксидазе. Так, Rutgers S.R. et al. обнаружили, что при тяжелом течении заболевания имеет место значимо повышенное высвобождение миелопероксидазы, которая в присутствии перекиси водорода и ионов галогенов (хлор) также подавляет активность ингибиторов протеиназ [83]. Эти факты доказываются в исследованиях Polanska V., который установил, что при ХОБЛ в ИМ увеличена концентрация и активность ИЛ-8, LTB<sub>4</sub>, миелопероксидазы, эластазы на фоне снижения функциональной активности  $\alpha_1$ -ПИ [66].

Важно отметить, что пациенты с патологией ингибиторной активности и активной бактериальной колонизацией характеризуются более высокой степенью воспаления в СОБ, в отличие от лиц без дефицита  $\alpha_1$ -ПИ. Причина выраженной воспалительной реакции в этом случае связана с усиленным высвобождением эпителиоцитами бронхов и макрофагами таких мощных хемоаттрактантов нейтрофилов как ИЛ-8, LTB<sub>4</sub>, что при снижении ингибиторной активности приводит к прогрессированию обструкции бронхов даже в стадию ремиссии заболевания [48, 49, 56, 66].

### **3. Современные представления о факторах резистентности к развитию ХОБЛ.**

В последние годы в литературе активно рассматривается вопрос о клеточных и молекулярных маркерах резистентности к развитию хронического воспаления в СОБ у лиц, злоупотребляющих никотином.

На ультраструктурном уровне установлено, что эндоплазматическая сеть (ЭПС) и митохондрии играют важную роль в структурной перестройке бронхиального дерева и адаптации организма к хроническому воздействию табачного дыма.

#### **3.1. Роль стресса эндоплазматической сети в развитии ХОБЛ.**

Основная функция ЭПС заключается в синтезе и созревании белков, предназначенных для секреции или экспозиции на поверхности клеточной мембраны. Синтез любой белковой молекулы предусматривает ее «фолдинг» (от англ. to fold — «укладывать, сворачивать») — самопроизвольное приобретение единственно правильного трехмерного строения (конформации). При активном функционировании клетки фолдинг может подвергаться постоянной модификации и есть риск развития «стресса ЭПС», который может нарушать функционирование клетки, вызывая ее гибель.

Для правильного созревания белка обязательно определенное соответствие между белок-синтетической нагрузкой и функциональной вместимостью ЭПС. В случае нарушения этого баланса происходит перегрузка ЭПС, мисфолдинг и, как результат, избыточное скопление в просвете сети неактивных и даже агрессивных белков. С целью поддержания динамического равновесия между двумя этими процессами в процессе эволюции эукариотические клетки приобрели сложный гомеостатический механизм, известный как «ответ на мисфолдинг» (unfolded protein response, UPR). Основная задача UPR - это компенсация стресса ЭПС, восстановление гомеостаза и, в конечном счете, предотвращение гибели клетки [109].

На основании данных современных исследований, можно уверенно говорить о значимой роли вышеописанного адаптивного процесса в патогенезе

целого ряда заболеваний человека. В том числе, в настоящее время много внимания отводится роли стресса ЭПС (дезадаптивной формы ответа на мисфолдинг) в развитии ХОБЛ [92, 94, 97, 98, 100, 101, 102, 103]. Окислительная нагрузка при хроническом воздействии сигаретного дыма может подавить способность эпителиоцитов поддерживать нормальный процесс синтеза и фолдинга белка.

Вероятно, у большей части курильщиков не развивается ХОБЛ вследствие высокоэффективного «ответа на мисфолдинг» в присутствии окислителей, что сопровождается напряжением ЭПС и активным увеличением продолжительности жизни клетки. UPR инициирует несколько сигнальных путей, что приводит к снижению трансляции белка, ограничению клеточного цикла, снижению поступления вновь синтезированного белка в полость эндоплазматической сети; расширение ее функциональной емкости путем увеличения количества шаперонов; шаперон-опосредованному сворачиванию белка, усилению высвобождения из эндоплазматической сети белков с необратимо нарушенной конформацией, а также повышенному распаду белков [91, 92, 93, 94, 99, 104]. Каждое из этих действий уменьшает перенапряжение (стресс) эндоплазматической сети и активизирует гомеостаза клетки. При недостаточности «защитных механизмов» или при нарушении их функционирования в клетке может наступать апоптоз.

Можно предположить, что постоянно курящие пациенты, у которых развивается ХОБЛ, имеют определенные дефекты системы «ответа на мисфолдинг» (UPR) и Nrf2 – сигнального пути, что требует дальнейшего исследования.

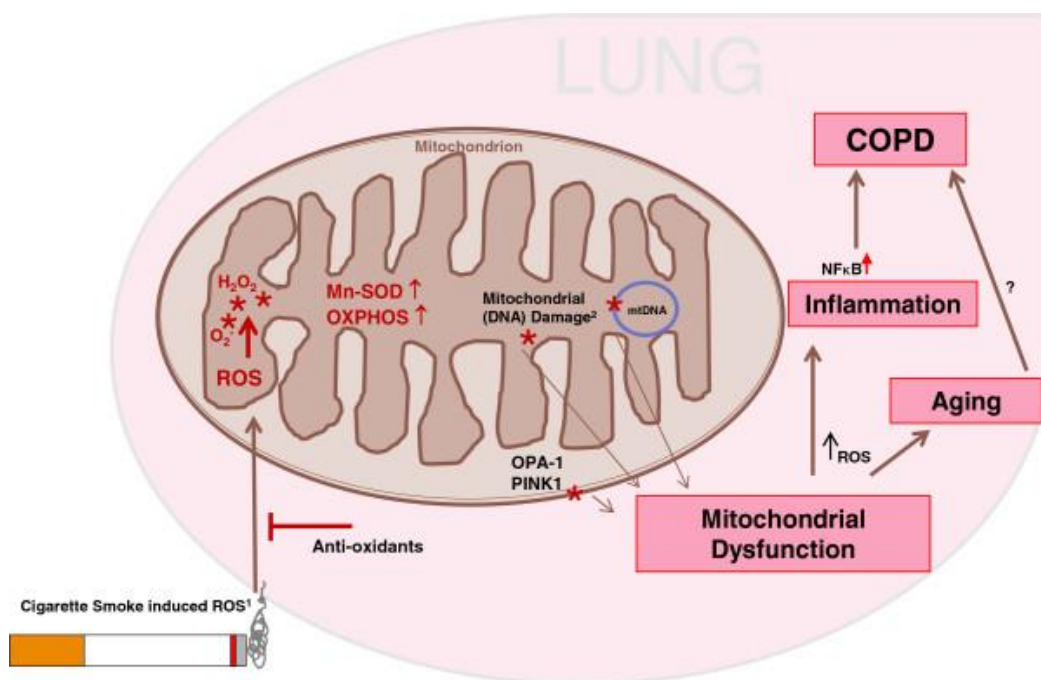
### **3.2. Роль митохондриальной дисфункции в развитии ХОБЛ.**

В последние годы особое внимание уделяется роли митохондрий в развитии ХОБЛ (рис. 3). Митохондрии являются автономными клеточными органеллами, которые отвечают за целый ряд функций, таких как обмен веществ, производство энергии, буферизацию кальция и регуляции процесса запрограммированной

клеточной гибели. Изменение морфологии данных клеточных органелл приводит к нарушению клеточного здоровья [122].

Сигаретный дым способен генерировать внутриклеточные АФК (активные формы кислорода), для которых митохондрии являются основными производителями. АФК способны повредить важные клеточные компоненты, такие как ядерная ДНК и органеллы. Кроме того, эндогенные АФК могут повлиять на митохондриальную ДНК, мембранные липиды и белки, в том числе белки деления / слияния и вызвать окислительную модификацию или блокирование системы окислительного фосфорилирования. Эти изменения сопровождались повышением уровня провоспалительных медиаторов ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-1 $\beta$ . Постоянное повреждение митохондрий в результате окислительного стресса приводит к нарушению антиоксидантной защиты и формирует митохондриальную дисфункцию. Длительное воздействие сигаретного дыма вызывает устойчивые структурные изменения в митохондриях эпителиальных клеток СОБ, что отражается в фрагментации, ветвлении и изменении количества крист. Важно отметить, что обнаруженные изменения являются лишь частично обратимыми и при исчезновении экспозиции табачного дыма не исчезают полностью. Длительное воздействие табачного дыма приводит к необратимым структурным изменениям и стойкой митохондриальной дисфункции.

Таким образом, митохондриальная дисфункция, индуцированная табачным дымом может провоцировать развитие воспаления и являться триггером в развитии ХОБЛ [120, 121, 122, 123, 124].



**Рисунок 3.** Модель митохондриальных изменений, индуцированных воздействием сигаретного дыма (по данным Hoffmann RF, Zarrintan S, Brandenburg SM. et al.)

В целом, проведенный анализ литературных данных не позволяют однозначно трактовать структурные изменения, развивающиеся в СОБ у курильщиков больных ХОБЛ, а также имеет место незначительное количество сведений об ультраструктурной дезорганизации эпителиоцитов бронхиальной стенки, приводящих к развитию исследуемого недуга.

#### 4. Резюме

В процессах ремоделирования бронхиальной стенки при ХОБЛ ключевое значение имеют провоспалительные, ростовые факторы, иммуоцитокны, протеиназы и их ингибиторы, а также в настоящее время пристальное внимание уделяется изучению роли стресса ЭПС и митохондриальной дисфункции. В основе структурно-функциональных изменений бронхиальной стенки лежит дисбаланс между иммунологической, нейроэндокринной и гуморальной системами. Дезорганизация их взаимосвязей приводит к повреждению архитектоники дыхательных путей, что является неотъемлемой частью клинико-функциональных проявлений ХОБЛ.

Литературные данные отчасти противоречивы и не дают полного представления об участии компонентов сигаретного дыма в реализации структурных нарушений дыхательной системы у пациентов с ХОБЛ. В большинстве случаев все изменения, наблюдаемые при исследуемой нозологии, рассматриваются через призму клинико-функциональных проявлений, но не подтверждаются данными на структурном (тканевом, клеточном и молекулярном) уровне.

Механизмы структурных нарушений, вызванных табачным дымом в СОБ подвергаются постоянным пересмотрам. В последние годы был накоплен достаточно большой объем данных в отношении стресса ЭПС и системы «ответа на мисфолдинг» (UPR), Nrf2 – сигнального пути, митохондриальной дисфункции, играющих ключевую роль в жизни, старении и гибели клетки в неблагоприятных условиях, в том числе и при длительном воздействии сигаретного дыма. Данные механизмы являются базисными в патогенезе ряда различных заболеваний, в том числе и ХОБЛ и требуют дальнейших разработок.

В настоящее время имеются немногочисленные работы по изучению конкретных механизмов резистентности к развитию обструктивной болезни легких у «здоровых» курильщиков, которые не дают целостного представления по данной проблеме. При этом на основе комплексного изучения механизмов резистентности к развитию ХОБЛ возможна разработка новых терапевтических и диагностических стратегий в отношении данного заболевания, что в целом и явилось поводом для настоящего исследования.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Организация исследования

Работа выполнена на базе Сибирского государственного медицинского университета (кафедры внутренних болезней педиатрического факультета, кафедры морфологии и общей патологии медико-биологического факультета, и ОГАУЗ "Городская клиническая больница №3" (отделений пульмонологии, патологической анатомии, клинической и биохимической лабораторий).

Дизайн и задачи исследования соответствовали одномоментному кроссекционному исследованию. Все обследованные пациенты были разделены на две группы – курильщики с диагнозом ХОБЛ (основная группа); курильщики без ХОБЛ (группа сравнения, «здоровые» курильщики). Весь биологический материал анализировался лично автором.

С целью отбора пациентов для исследования были разработаны критерии включения/исключения

*Критерии включения в основную группу (курильщики с диагнозом ХОБЛ):*

1. Верифицированный диагноз ХОБЛ;
2. Длительный стаж курения (не менее 20 лет);
3. Возраст от 45 до 65 лет;

*Критерии включения в группу сравнения («здоровые» курильщики, курильщики без ХОБЛ, курящие лица без ХОБЛ):*

1. Отсутствие верифицированного диагноза ХОБЛ по данным спирометрии (клинико-функциональные тесты в пределах нормы);
2. Длительный стаж курения (не менее 20 лет);
3. Возраст от 45 до 65 лет;
4. Амбулаторный статус пациента

*Критерии исключения из исследования:*

1. нежелание пациента принимать участие в исследовании, отсутствие информированного согласия;



2. наличие тяжелых сопутствующих заболеваний, злокачественных новообразований или других хронических заболеваний в стадии декомпенсации.

3. наличие других заболеваний бронхолегочной системы – с верифицированным диагнозом бронхиальной астмы; дефицит  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора, бронхоэктатическая болезнь, буллезная эмфизема легких, кисты легких, асбестоз, резекция части легких или их трансплантация; перенесшие тяжелые формы туберкулеза легких, травмы грудной клетки;

4. наличие психических расстройств, прием психотропных и наркотических препаратов;

## **2.2. Клиническое обследование**

Сбор анамнеза и жалоб проводили на момент госпитализации пациентов в отделение пульмонологии. Социальный анамнез включал в себя род занятий, особенности условий труда и быта, продолжительность отягощенного профессионального анамнеза, длительность курения, возраст начала курения и интенсивность. В анамнезе жизни отмечали сопутствующие заболевания, аллергологический статус. Особое внимание уделялось выявлению у пациентов заболеваний сердечно-сосудистой системы, таких как ИБС, гипертоническая болезнь, сахарного диабета. Регистрировали указания на наследственную отягощенность по заболеваниям органов дыхания, а также онкопатологию.

При изучении анамнеза заболевания отмечали возраст первых клинических проявлений хронического бронхита, синдрома одышки, время верификации диагноза ХОБЛ или его исключение, время начала базисной терапии, частоту обострений, перенесенные ранее заболевания органов дыхания.

При исследовании общего соматического статуса оценивали состояние кожных покровов и видимых слизистых оболочек, степень развития подкожно-жировой клетчатки, температурную реакцию, пульс, артериальное давление, сатурацию кислорода в периферической крови, клинические признаки дыхательной недостаточности, дистанционные хрипы, большое внимание уделяли наличию бочкообразной деформации грудной клетки, характеристике перкуторного звука (наличие коробочного перкуторного звука) и аускультативной

картине (наличие бронхообструктивного синдрома, признаков пневмофиброза и эмфиземы). При исследовании сердечно - сосудистой системы обращали внимание на наличие синдрома сердечной недостаточности, как проявления декомпенсации легочного сердца, выраженность сердечного толчка в эпигастральной области, акцент 2-ого тона на легочной артерии и пульсации крупных сосудов шеи.

### **2.3. Клинико-функциональная характеристика больных, включенных в исследование**

Под наблюдением находилось 115 курильщиков. Все обследованные в ходе работы пациенты были курильщиками с длительным стажем: оценка индекса курения по шкале пачка/лет показала, что интенсивность курения составляла в среднем 45 (35-65) пачка-лет. В 53,0% случаев было отмечено присутствие профессиональной вредности в среднем в течение 20 (10-30) лет.

Женщины составили меньшинство обследованных, 11 человек из всей выборки пациентов (9,6%): 5 человек в группе сравнения и 6 человек в группе ХОБЛ. Большая часть пациентов была в возрасте от 40 до 60 лет (58,3%), средний возраст по выборке составил  $59,7 \pm 8,5$  лет. При этом в группе сравнения, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) - 60 лет (54-65 лет), в группе ХОБЛ - 56,5 лет (53-65 лет). Анализ пола и возраста пациентов обеих групп позволил исключить факторы пола и возраста из спектра рассматриваемых предикторных факторов развития заболевания в силу отсутствия достоверных различий по этим признакам у пациентов обеих групп ( $p=0,18$  и  $p=0,69$  соответственно).

По окончании формирования выборки, произвели деление курильщиков на группы: основная, 83 человека с верифицированным диагнозом ХОБЛ, и группа сравнения (курильщики без ХОБЛ) в количестве 32 человека. Деление на 2 группы производилось на основании результатов спирометрического обследования (табл. 1).

**Таблица 1**

#### **Сравнительная клинико-функциональная характеристика обследованных групп пациентов, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

| Показатели       | Группа сравнения,<br>(n=32) | Основная группа,<br>(n = 83) | p              |
|------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|
| ОФВ1 до (П)      | 90,6 (88,0-102,2)           | 42,3 (28,7-55,1)             | <b>p=0,001</b> |
| ОФВ1 после БД    | 95,8 (88,1-107,3)           | 41,0 (31,0-54,8)             | <b>p=0,001</b> |
| ФЖЕЛ(после БД)   | 100,7 (93,6-112,6)          | 79,5 (68,3-92,5)             | <b>p=0,001</b> |
| ОФВ1/ФЖЕЛ        | 74,0 (69,0-78,0)            | 41,3 (33,2-50,9)             | <b>p=0,001</b> |
| Прирост ОФВ1/ml  | 130,0 (10,0-220,0)          | 120,0 (50,0-210,0)           | p=0,78         |
| Прирост ОФВ1 (%) | 3,9 (0-8,5)                 | 11,6 (3,2-20,4)              | <b>p=0,003</b> |

*Примечание: n – количество пациентов; p–статистическая значимость различий;*

Статистически значимые различия получены практически по всем исследуемым показателям, что в целом носит закономерный характер, так как спирометрическое исследование является одним из базовых при верификации диагноза ХОБЛ. Среднее значение ОФВ1 до пробы с бронходилататором в группе ХОБЛ было в 2,1 раза ниже, чем в группе сравнения. После пробы с бронходилататором картина не изменилась: значение ОФВ1 было в 2,3 раза ниже, чем в группе сравнения ( $p < 0,001$ ). Показатель ФЖЕЛ исследовали в обеих группах после пробы с бронходилататором. Данный показатель был статистически значимо ( $p < 0,001$ ) выше в группе курильщиков без ХОБЛ. В отношении показателя ОФВ1/ФЖЕЛ не было получено отклонения от сложившейся тенденции достоверного различия основной группы и группы сравнения в рамках спирометрического исследования: в группе курильщиков с ХОБЛ данный показатель был в 1,8 раз ниже, чем в группе «здоровых» курильщиков ( $p < 0,001$ ), и был ниже диагностического значимого минимума (менее 70%) необходимого для установления диагноза ХОБЛ. В ходе исследования значимой обратимости бронхообструкции характерной для бронхиальной астмы выявлено не было (более 200 мл и более 20%). Выявленные нами статистически значимые различия основной группы и группы сравнения по ряду основных показателей (ОФВ1 до и после пробы с БД, ФЖЕЛ, отношение ОФВ1/ФЖЕЛ) подтверждает обоснованность выборки исследуемых пациентов и деление их на группы.

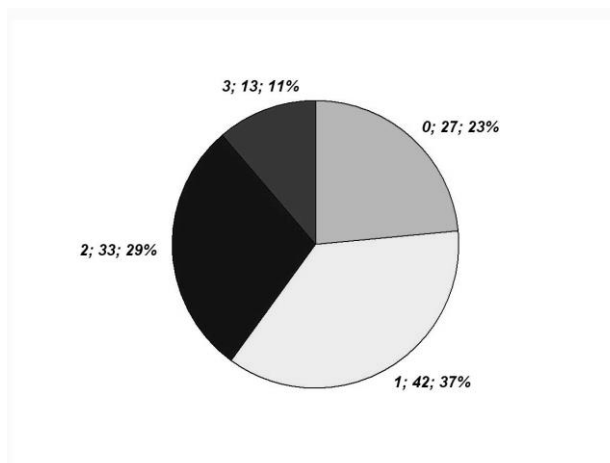
Согласно рекомендациям, GOLD 2011, 2017 г. диагноз ХОБЛ был верифицирован на основании данных анамнеза, клинической картины заболевания (продуктивный кашель, одышка), объективного обследования (бронхообструктивный синдром, признаки эмфиземы), спирометрического исследования (снижение ОФВ1, снижение отношения ОФВ1/ФЖЕЛ менее 70%). Среди курильщиков с ХОБЛ у 2 (1,2 %) была выявлена 1 степень тяжести бронхообструкции, у 23 (28,4%) – 2 степень; у 33 (40,7%) – 3 степень и в 24 случаях (29,6%) выявлена 4 степень тяжести бронхиальной обструкции.

У 22 пациентов (68,75%) группы сравнения был выявлен хронический простой (необструктивный) бронхит, характеризовавшийся продолжительностью 12,5 (7,0-20,0) лет и возрастом начала заболевания 45 (35-50) лет. Следует отметить, что столь значимый процент обусловлен высоким риском развития хронического необструктивного бронхита под воздействием курения. Диагноз хронического бронхита был верифицирован на основании жалоб и анамнеза (кашлевой синдром на протяжении 3 месяцев в течение 2 лет) и на основании описания картины катарально-атрофического эндобронхита при БФС.

Одышка была выявлена у всех пациентов группы курильщиков с ХОБЛ, длительность симптома составила в целом по выборке 5 (2-10) лет, а возраст ее возникновения соответственно 52 (45-60) лет.

Важно отметить, что у пациентов обеих групп нами обнаружена наследственная отягощенность в отношении нескольких нозологий (в 13% – аллергия; в 19,1% – бронхиальная астма; в 6,1% – онкозаболевания органов дыхания).

Среди обследованных у 27 человек сопутствующие заболевания не были выявлены, что составляет 23% от всей выборки, включенных в исследование; у 73 человек нами выявлены различные сопутствующие заболевания: одно – в 37 %; два – в 29 %; три – в 11 % (рис. 4).



**Рисунок 4.** *Распределение выборки обследованных пациентов по частоте выявления сопутствующей патологии: первый показатель – количество заболеваний, второй показатель – количество исследуемых, третий показатель - % исследуемых от выборки в целом.*

Нозологические формы сопутствующей патологии распределились следующим образом: в 62% – гипертоническая болезнь; в 40% выявлена ишемическая болезнь сердца; в 21% выявлена язвенная болезнь желудка или двенадцатиперстной кишки; в 5% – сахарный диабет II типа.

#### 2.4. Методы исследования

В работе использовались клиничко-лабораторные исследования, которые включали в себя общий крови (серомукоиды, общий белок, глюкоза), общий анализ мокроты, биохимические исследования, иммуноферментный анализ и клиничко – функциональные методы (спирометрия, ЭКГ, УЗИ сердца с исследованием фракции выброса ЛЖ (%), толщины стенки правого желудочка (мм) и наличия легочной гипертензии (мм рт.ст). Как основные были использованы морфологические методы, которые включали в себя гистологические, морфометрические, электронно-микроскопические, а также цитологические.

Материалом исследования явились сыворотка крови пациентов, биоптаты слизистой оболочки правого среднедолевого бронха, бронхиальные смывы (БС), полученные во время бронхоскопии, а также образцы пристеночной слизи, взятой в процессе индуцированного мокротоотделения у пациентов с различными стадиями ХОБЛ и «здоровых» курильщиков (группа сравнения).

Данное исследование одобрено локальным комитетом по этике ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России г. Томска № 2833/1 от 31.11.2011.

#### **2.4.1. Исследование вентиляционной функции легких (спирометрия)**

Благодаря оборудованию фирмы Jaeger, Германия (1998 год) и программному обеспечению МастерСкрин Пневмо нами исследовалась функция внешнего дыхания путем анализа кривой «поток - объем» и показателей спирометрии. Согласно протоколу исследования, все пациенты за 8 часов до проведения всех манипуляций не принимали антихолинэргические препараты, а также симпатомиметики, метилксантины короткого действия, теофиллины и  $\beta_2$ -агонисты пролонгированного действия. После проведения исследования проводилась компьютерная обработка полученных данных с вычислением должных величин и регистрацией их в системе ВTPS. Перед проведением данных манипуляций все пациенты были проинструктированы и обучены выполнению дыхательных маневров. Перед исследованием проводилась проба с бронхолитиками (сальбутамол в дозе 400 мкг (4 дозы)) [266]. Спирометрия анализировалась по следующим показателям: объем форсированного выдоха за 1 секунду ( $ОФВ_1$ ) до и после пробы с бронхолитиком, прирост  $ОФВ_1$  после пробы с бронхолитиком в миллилитрах и процентное соотношение от исходного показателя. отношение  $ОФВ_1/ФЖЕЛ$  (модифицированный индекс Тиффно), жизненная емкость легких (ЖЕЛ).

#### **2.4.2. Исследование цитологического состава бронхиальных смывов**

Смывы со слизистой оболочки правого среднедолевого бронха (БС) проводили во время бронхоскопии. При проведении этой процедуры пациенту через тубус бронхоскопа порциями вводили стерильный изотонический раствор, подогретый до  $37^\circ \text{C}$ . Общий объем жидкости составлял 40-60 мл. Далее проводили аспирацию исследуемой жидкости в силиконизированный контейнер [250, 251]. Полученные в результате данной манипуляции БС подвергали центрифугированию в течение 10 мин со скоростью 1500 об/мин. Биохимический и иммунологический анализ проводили в предварительно замороженной надосодочной жидкости. Абсолютное количество клеток подсчитывали в камере

Горяева на 1 мл. БС. Оставшуюся лаважную жидкость повторно подвергали центрифугированию при 1500 об/мин в течение 5 мин. В дальнейшем из клеточного осадка приготавливали цитологические препараты (3-5 шт.) [250]. Цитологические мазки лаважной жидкости окрашивали азуром-II-эозином и микроскопировали с использованием бинокулярного светового микроскопа Karl Zeis «Axioskop 40 FL. при увеличении 1500.

В цитологических препаратах подсчитывалось относительное (на 300 клеток) и абсолютное количество различных клеточных популяций. Цитограмма мазков, выполненных из лаважной жидкости, формировалась из следующих клеток: макрофаги (МФ), нейтрофильные гранулоциты (НФ), эозинофильные гранулоциты (ЭФ), лимфоциты (ЛФ), клетки эпителия бронхов обычного строения (БЭОС), клетки эпителия бронхов с признаками дистрофии (БЭСД), бокаловидные экзокриноциты (БК).

Клетки крови в цитологических мазках лаважной жидкости идентифицировались согласно их гематологическим характеристикам [232].

БЭОС отличались наличием апикальной и базальных частей, в последней идентифицировалось ядро с сетчатой структурой хроматина и несколькими ядрышками. В апикальной части всегда выявлялись реснички. В гомогенной цитоплазме этих клеток нередко определялась мелкая базофильная зернистость.

БЭСД характеризовались отсутствием ресничек на апикальной части, более базофильной окраской цитоплазмы, множественными вакуолями в ней, гетерогенной структурой хроматина в ядре.

БК, которые идентифицировались в цитологических мазках БС имели округлую или овальную форму. Апикальная часть этих клеток резко расширена, содержала пенистую цитоплазму с множественными вакуолями, в базальной части идентифицировалось серповидное или округлое гиперхромное ядро [233].

### **2.4.3. Цитологическое исследование индуцированной мокроты**

У некоторых курящих пациентов с ХОБЛ невозможно провести бронхоскопическое исследование с получением бронхиального секрета. В этой связи нами анализировалась бронхиальная слизь, полученная путем

индуцированного мокротоотделения. Индуцированную мокроту (ИМ) забирали с согласия пациентов, утром, натощак после предварительных ингаляций стерильного 3-, 4-, 5% раствора натрия хлорида через ультразвуковой небулайзер "Ультра НЕБ 2000" [252].

Бронхиальный секрет, полученный путем индуцированного мокротоотделения подвергали диспергированию и гомогенизации с 1% раствором дитиотреитола в соотношении 1:1. В дальнейшем суспензию отмывали в растворе Хэнкса (физиологическом растворе), центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин. С помощью камеры Горяева в 1 мл. полученной суспензии подсчитывали абсолютное число клеток. Осадок ИМ использовался для приготовления цитологических препаратов (3-5 стекол) [253].

Цитологическое исследование окрашенных азуром-II и эозином препаратов ИМ осуществляли на светооптическом микроскопе Karl Zeis «Axioskop 40 FL. В цитологическом материале ИМ подсчитывалось относительное и абсолютное число клеток каждого типа. Клеточный состав ИМ включал следующие популяции: МФ, НФ, ЭФ, ЛФ, БЭСД. Определение и подсчет клеточных элементов в цитологических мазках ИМ осуществлялось в соответствии с их цитологическими характеристиками.

#### **2.4.4 Морфологическое исследование бронхобиоптатов (слизистой оболочки бронхов)**

Бронхоскопическое исследование с получением бронхобиоптатов реализовывалось в условиях фибробронхоскопического кабинета, утром, натощак.

Основным показанием для проведения эндоскопического исследования у исследуемых групп пациентов явилась необходимость уточнения диагноза, а также с целью исключения других болезней органов дыхания.

С помощью фибробронхоскопа BF-P20D (Olimpus, Япония) осуществлялась визуализация структур бронхиального дерева и производился забор щипковых биопсий (3-4 фрагмента) со слизистой оболочки правого среднедолевого бронха. Одну часть гистологического материала фиксировали в 10-12% забуференном



растворе формалина в течение 24 часов, затем использовали для гистологических и гистохимических методов исследования [254, 255]. Другую часть бронхиобоптатов подвергали фиксации в 2,5% растворе глютарового альдегида на 0,2 М какодилатном буфере с pH=7,2 при температуре +4°C и далее подвергали дополнительной фиксации в 1% растворе OsO<sub>4</sub> на холоде в течение 4 часов для проведения ультраструктурных анализов [256, 257].

#### **2.4.4.1. Гистологические методы исследования**

Материал для гистологического исследования (бронхиобоптаты) фиксировали в 10% забуференном (pH 7,4) формалине (БиоВитрум, Россия), промывали в воде, обезвоживали в Isoprep (БиоВитрум, Россия), заливали в парафиновую смесь HISTOMIX (БиоВитрум, Россия) [255]. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью ротационного микротомы Ассу-Сут®SRM™200 («Sakura» Япония). Срезы, смонтированные на предметные стекла, окрашивали и заключали в канадский бальзам [254, 255].

Обзорная микроскопия и морфометрия реализовывались на микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Для оценки выраженности фиброза использовали окраску пикрофуксином по Ван-Гизону [254, 255]. Идентификацию тучных клеток (ТК) и эозинофилов (ЭФ) производили на срезах, окрашенных с помощью сочетанной окраски основным коричневым и прочным зеленым по методу, предложенному В.Ю. Голофеевским, С.Г. Щербак [258].

ТК с гранулами, окрашивались в коричневый цвет, а специфическая зернистость эозинофилов, которая содержала катионные белки в различные оттенки изумрудного цвета. При морфометрическом исследовании подсчитывали клетки с высокой (I), умеренной (II) и низкой (III) степенью дегрануляции (соответственно, низко-, умеренно- и высокогранулированные клетки) с последующим подсчетом среднего цитохимического коэффициента (СЦК), который характеризовал функциональную активность клеток.

#### 2.4.4.2 Морфометрическое исследование

Морфологическое исследование бронхобиоптатов осуществлялось под световым микроскопом Karl Zeis «Axioskop 40 FL» с оценкой выраженности воспалительных, дисрегенераторных (пролиферация базальных клеток, наличие плоскоклеточной метаплазии и бокаловидноклеточной гиперплазии), а также фиброзных изменений.

На гистологических препаратах (7-10 случайных полей зрения для каждого среза) и на  $1 \text{ мм}^2$  ткани бронхов измеряли при помощи программы ImageJ 1.48. (режим доступа <http://www.rsb.info.nih.gov/ij/>) следующие морфометрические параметры. Благодаря Plugins «Grid» в биоптатах бронхиальной стенки подсчитывали объемные плотности ( $\text{мм}^3/\text{мм}^3$ ) всего покровного эпителия (VVпэ), отдельных клеток эпителиального пласта (VVрэ, VVбэ, VVбзэ), соединительной ткани (VVст), желез (VVжел), сосудов микроциркуляторного русла (VVмс). Вычисляли бокаловидноклеточный индекс (отношение объемных плотностей бокаловидных к реснитчатым эпителиоцитам (VVбэ/VVрэ) и базальноклеточный коэффициент (отношение объемной плотности базальных к реснитчатым клеткам (VVбзэ/VVрэ). Диаметр сосудов, высота эпителия и толщина базальной мембраны определялась нами в микрометрах с использованием окуляр-микрометра [259, 260]. Plugins «Cell» программы ImageJ 1.48 позволила в  $1 \text{ мм}^2$  ткани бронхов подсчитать плотность воспалительного инфильтрата и различных клеточных представителей (МФ, ЛФ, полиморфноядерных лейкоцитов), а также общее число их межэпителиальных форм. На  $1 \text{ мм}^2$  препарата, покрашенного сочетанной окраской на ЭФ и ТК подсчитывали плотность распределения всех клеток, а также с различной степенью их грануляции. Для оценки взаимоотношений клеток эпителия и стромы в  $1 \text{ мм}^2$  бронхобиоптата нами вычислялось общее число фибробластов.

#### 2.4.4.3 Методы электронно-микроскопического исследования

Образцы бронхобиоптатов не более  $2 \text{ мм}^3$  фиксировали в 4% параформальдегиде (Serva, Германия) на буфере Хэнкса (рН 7,4) 24 ч при  $4^\circ\text{C}$ , затем в забуференном (рН 7,4) 1%  $\text{OsO}_4$  (SPI, США) 3 ч при  $4^\circ\text{C}$  [259]. Образцы

обезвоживали в этиловом спирте, после чего заливали в смесь эпоксидных смол (Epon 812 – 4 г, Araldite 502 – 2 г, DDSA – 9 г). После полной полимеризации смол на ультратоме Leica EM UC 7 (Leica, Австрия) получали полутонкие (1 мкм) и ультратонкие срезы (80 нм). Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим; ультратонкие срезы помещали на гексагональные медные сетки (D=3 мм, 200 mesh), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, затем просматривали на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) и фотографировали при увеличениях от 4800 до 24000. Описание и оценка удельного объема внутриклеточных структур приводилась с использованием метода точечносчетной морфометрии [261, 262, 263].

При ультраструктурном исследовании реснитчатых, бокаловидных и базальных клеток СОБ в них визуализировались удельные объемы (УО) ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ) митохондрий, эндоплазматического ретикулума, лизосом, ядерно-цитоплазматическое отношение (отношение удельного объема ядра к объему клетки, ЯЦО). На микрофотографиях бронхобиоптатов оценивали УО ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ) капилляров с относительным подсчетом различных клеток эндотелиальной выстилки – основной тип, светлые (отечные) и темные (гиперосмированные) эндотелиоциты [267]. На люминальной поверхности эндотелиальных клеток капилляров СОБ подсчитывали объемную плотность микропиноцитозных везикул (МПВ) ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ), УО секреторных гранул Вейбеля – Палади (%), а также их диаметр (нм).

#### **2.4.5. Биохимический анализ бронхиальных смывов и индуцированной мокроты**

Перед проведением исследования образцы бронхиального секрета, полученного путем смывов с бронхов и методом индуцированного мокроотделением размораживали и гомогенизировали в 1 мл 0,9% физиологического раствора. Затем полученную смесь центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин. В надосадочной жидкости спектрофотометрическим методом оценивали активность эластазы,  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора ( $\alpha_1$ -ПИ) [36, 264].

***Оценка протеазной и антипротеазной активности ферментов в  
бронхиальной слизи***

Активность эластазоподобных протеиназ измеряли по скорости гидролиза п-нитрофенилового эфира N-бутилоксикарбонил- L-аланина (БАНЭ) и в дальнейшем по приросту оптической плотности при длине волны 347,5 нм [87, 113, 253].

В кювете спектрофотометра производили перемешивание 0,2 мл бронхиальной слизи, полученной путем смывов и методом индуцированного мокроотделения с 2,7 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера (рН=6,5). Далее в среду добавляли 0,1 мл раствора БАНЭ, перемешивали и измеряли прирост оптической плотности в течение 5 мин, при длине волны 347,5 нм. Контрольная жидкость содержала 2,9 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7,4) и 0,1 мл раствора БАНЭ. Активность рассчитывали в нмоль БАНЭ/мин на 1 мл биологической жидкости по формуле:

$$5460 * E_{347,5}/0,1,$$

где 5460 - коэффициент пересчета;  $E_{347,5}$  - прирост оптической плотности; 0,1 мл исследуемого биологического секрета.

Активность  $\alpha_1$ -ПИ определяли по торможению аргинин-эстеразной активности трипсина при длине волны 253 нм. Готовили 2 опытные пробы и один контрольный образец.

Первая проба – содержала 1,9 мл 0,05 М трис HCl буфера (рН=8.0) и 0,1 мл 0,01% раствора трипсина, а вторая – 1,8 мл 0,05 трис HCl буфера. Далее в пробы добавляли соответственно 0,1 мл 0,01 % раствор трипсина и 0,1 мл бронхиального секрета, выдерживали 5 минут при 25°C, затем обе пробы смешивали с 1мл 1,5 mM раствора БАНЭ. Контрольная проба содержала 2 мл 0,05 М трис-HCl буфера и 1 мл 1,5 mM раствора БАНЭ. В течение 1 мин. при длине волны 253 нм измеряли прирост оптической плотности опытных проб по сравнению с контролем. Расчет ингибиторной активности проводился по формуле:

$$(V_1-V_2) * 2,73,$$

где  $V_1, V_2$  -прирост оптической плотности 1 и 2 опытных проб за 1 мин; 2,73 – расчетный коэффициент

#### **2.4.6 Иммунологическая оценка показателей бронхиальных смывов и индуцированной мокроты**

С помощью иммуноферментного анализа в надсадке БС и ИМ подсчитывали концентрацию следующих цитокинов: интерферона- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ), ИЛ-4 и их соотношение, ИЛ-8, ИЛ-10, TNF- $\alpha$  («Вектор-Бест» Новосибирск), а также TGF- $\beta_1$  («Roche» Швеция). С помощью твердофазного иммуноферментного анализа типа сэндвич нами производилась количественная оценка исследуемых иммунорегуляторных молекул. В наборах, для количественного определения данных цитокинов и ростовых факторов обнаруживались 4 реагента: моноклональные антитела к ИНФ- $\gamma$ , ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta_1$ , иммуноцитокнины в исследуемых бронхиальных секретах, биотинилированные антитела к исследуемым молекулам, а также стрептовидин-пероксидазная система визуализации. Концентрацию исследуемых иммунорегуляторных молекул учитывали спектрофотометрически с применением спектрофотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрация исследуемых факторов в образце прямо пропорциональна интенсивности окраски раствора.

#### **2.4.7. Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку результатов производили с помощью статистического пакета «Statistica for Windows 6.0» («Stat Soft, Inc.», USA, 1984-2001) (Боровиков В.М., 2001). Проверку распределения на соответствие нормальному закону осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты работы представлены в виде медианы (Me), меру рассеяния – в виде квартильного интервала ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ).

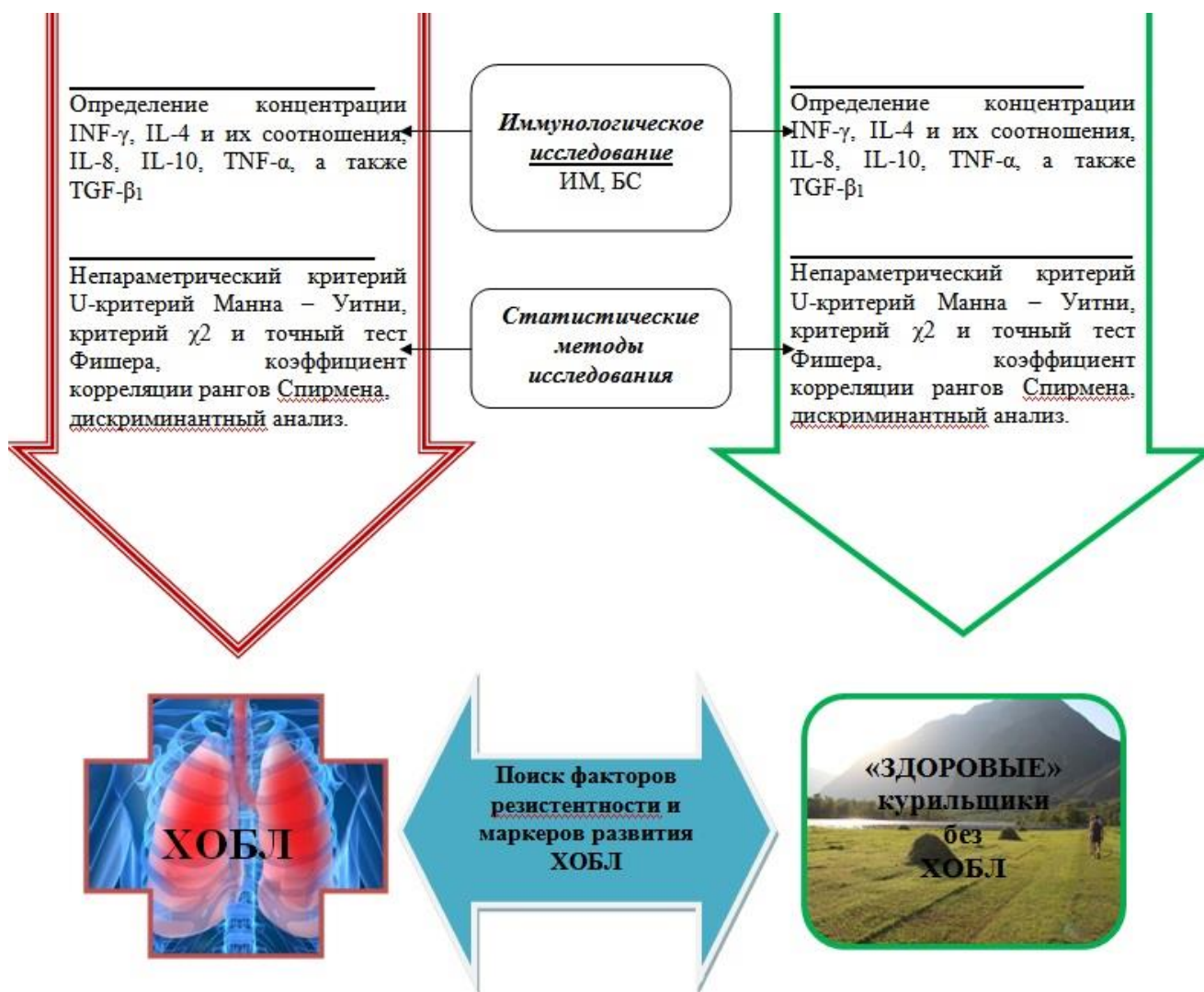
Для выяснения достоверности различий значений цитологических, морфологических, иммунологических и биохимических показателей между клиническими группами и внутри групп использовали критерий Манна-Уитни.

Для выяснения значимости различий качественных признаков использовали

точный тест Фишера. Сопряженность между полученными данными определяли посредством оценки коэффициентов корреляции рангов Спирмена. Для оценки роли различных маркеров в ремоделирование бронхиальной стенки, а также для выявления тканевых и клеточных факторов ее резистентности к длительному воздействию табачного дыма использовали дискриминантный анализ. Критическим уровнем значимости считали значение  $p < 0,05$ .

#### 2.4.8. Дизайн исследования





14.01.25 – пульмонология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Клинико-функциональная характеристика пациентов, включенных в исследование

#### 3.1.1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

В первую очередь при описании клинической характеристики следует отметить, что все обследованные были курильщиками с длительным стажем: оценка индекса курения по шкале пачка/лет показала, что интенсивность курения составляла по выборке 45 (35-65) пачка-лет.

В обеих группах присутствовали пациенты в анамнезе которых обнаруживался длительный контакт с профессиональной вредностью: 46 человек (55,4%) в группе ХОБЛ и 15 человек (46,9%) в группе сравнения ( $p > 0,05$ ).

Результаты комплексного исследования, включавшего в себя сбор анамнестических, клинических и объективных данных представлены в таблице 2.

**Таблица 2**

#### Сравнительная характеристика показателей в группе сравнения и группе курильщиков с ХОБЛ

| Нозология   | Группа сравнения,<br>n = 32 | ХОБЛ,<br>n = 83 | p            |
|---|-----------------------------|-----------------|--------------|
| Наследственность по БА  | 1                           | 11              | 0,10         |
| Наследственность онкологическая   | 5                           | 2               | <b>0,033</b> |
| Аллергоанамнез (наличие различных аллергических заболеваний, за исключением БА) | 3                           | 4               | 0,42         |
|   | Сопутствующая патология     |                 |              |
| ИБС   | 13                          | 33              | 0,55         |
| Гипертоническая болезнь   | 14                          | 55              | <b>0,034</b> |
| Сахарный диабет   | 3                           | 3               | 0,35         |
| Язвенная болезнь желудка  | 4                           | 20              | 0,21         |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий; БА – бронхиальная астма; ИБС – ишемическая болезнь сердца.*



При анализе наследственной отягощенности нами не было обнаружено статистически значимых различий между исследуемыми группами в отношении бронхиальной астмы, аллергической патологии, ИБС и язвенной болезни желудка.

Наибольший интерес вызывала частота выявления гипертонической болезни, которую отметили в 66,3% случаев у пациентов основной группы (ХОБЛ) и в 45,2 % случаев у лиц группы сравнения ( $p=0,034$ ). Данная закономерность находит подтверждение в результатах инструментальных методов объективного обследования: так величина систолического и диастолического артериального давления были статистически значимо ( $p=0,027$  и  $p=0,044$ ) выше в основной группе.

У курильщиков с ХОБЛ в 71,4 % случаев было верифицировано наличие хронического легочного сердца и легочной гипертензии по данным ультразвукового исследования сердца, ЭКГ и рентгенографии органов грудной клетки.

### **3.1.2. Результаты лабораторного обследования курильщиков.**

#### **Некоторые биохимические маркеры крови.**

В ходе исследования был проведен анализ ряда биохимических маркеров в сыворотке крови, по результатам которого не было выявлено статистически достоверных различий между исследуемыми группами по следующим показателям: средний уровень серомукоидов, уровень глюкоземии. В отношении уровня общего белка крови выявлено достоверное различие в исследуемых группах ( $p = 0,05$ ), однако среднее значение в обеих группах находились в пределах физиологической нормы. Уменьшение же значения содержания общего белка в группе курильщиков с ХОБЛ возможно связано с системными эффектами заболевания [240,241] (табл. 3).

**Таблица 3**

#### **Сравнительная характеристика биохимических показателей у обследованных групп пациентов, Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)**

| Показатели | Группа сравнения,<br>n=32 | ХОБЛ,<br>n=83 | p |
|------------|---------------------------|---------------|---|
|            |                           |               |   |

|                  |                     |                     |             |
|------------------|---------------------|---------------------|-------------|
| Серомукоиды, Е/л | 341,0 (250,0-605,0) | 270,0 (207,0-345,0) | 0,10        |
| Глюкоза, ммоль/л | 5,9 (5,2-6,6)       | 5,8 (5,3-6,4)       | 0,56        |
| Белок, г/л       | 73,0 (70,0-77,0)    | 70,5 (72,0-78,0)    | <b>0,05</b> |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий;*

Заключение: таким образом, при изучении ряда биохимических маркеров достоверные различия между основной группой и группой сравнения были получены только в отношении общего белка, при этом данный показатель не выходил за пределы допустимой физиологической нормы. В отношении других показателей обращает на себя внимание – повышение уровня островоспалительных белков (серомукоидов) в обеих группах, что находит отражение в зарубежной и отечественной литературе [242,243].

### **3.2. Биохимический анализ индуцированной мокроты и бронхиальных смывов в группе сравнения и при ХОБЛ**

Сравнительная оценка активности эластазы и  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора показала, что самые высокие значения ферментативной активности эластазы наблюдались в ИМ группы курильщиков с ХОБЛ и составили 2,85 (0,55 - 4,25) нмоль БАНЭ мин/мл, что практически в 3 раза превышает данные значения в группе «здоровых» курильщиков (0,97 (0,46-1,09) нмоль БАНЭ мин/мл). При изучении активности эластазы в бронхиальных смывах не было получено статистически достоверных различий ( $p = 0,124$ ), при этом имеет место тенденция к повышению данного показателя в группе ХОБЛ. В литературе достаточно редко встречаются данные по исследованиям активности эластазы в бронхиальных смывах. При этом отсутствие достоверных различий по анализируемому показателю не соответствует результатам, полученным в отношении индуцированной мокроты. Данный факт, вероятно, обусловлен разными методами получения биологического материала: в случае бронхиального смыва – его получали из нижних отделов воздухоносных путей, бронхиальная слизь которых отличалась меньшей концентрацией белка по сравнению с верхними отделами дыхательных путей.

При оценке антипротеиназной активности у курильщиков с ХОБЛ нами выявлено статистически значимое ( $p=0,042$ ) снижение активности  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора по сравнению с группой сравнения при исследовании ИМ и бронхиальных смывов (табл. 4). При этом обращает внимание преимущественное снижение средних значений активности  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора в основной группе именно в БС в 4 раза.

Полученные данные в полной мере отражают дисбаланс в протеиназ-антипротеиназной системе дыхательных путей. Таким образом, система протеиназы/антипротеиназы у «здоровых» курильщиков характеризовалась высокой активностью антипротеолитического фермента  $\alpha_1$ -ПИ, что позволяет реализовать эффективную защиту тканей бронхолегочной системы от деструктивного воздействия протеиназ. У курильщиков с ХОБЛ выявлен дисбаланс протеиназ и антипротеиназ, обусловленный увеличением содержания протеолитического фермента (эластазы) и уменьшением активности ингибитора, необходимого для угнетения хронического воспалительного процесса в слизистой оболочке дыхательных путей.

Вероятно, обнаруженное нами одновременное повышение функциональной активности  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора при высокой концентрации эластазы (инициируемой факторами табачного дыма) у «здоровых» курильщиков является одним из механизмов, защищающих исследуемую группу от развития ХОБЛ [112].

Установлено, что курение способствует оксигенации активного центра протеиназного ингибитора в СОБ, а образующиеся полимеры являются хемоаттрактантами для нейтрофилов, секретирующих эластазу и поддерживающих хроническое воспаление в бронхиальной стенке [244, 245, 246]. В то же время снижение активности протеиназного ингибитора может быть связано и с уменьшением общего числа альвеолярных макрофагов, продуцирующих данный протеин в дыхательных путях [265].

**Таблица 4**

**Активность эластазы и ее ингибитора в индуцированной мокроте и  
бронхиальных смывах у обследованных групп пациентов, Ме (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)**

| Показатель                                | Тип биологической жидкости | Группа сравнения<br>n=32 | ХОБЛ,<br>n=83        | p             |
|---|----------------------------|--------------------------|----------------------|---------------|
| Активность эластазы, нмоль БАНЭ мин/мл    | Индуцированная мокрота     | 0,97 (0,46-1,09)         | 2,85 (0,55 - 4,25)   | <b>0,027</b>  |
|   | Бронхиальные смывы         | 0,813 (0,345 – 1,535)    | 1,23 (0,586 – 2,314) | 0,124         |
| $\alpha_1$ -протеиназный ингибитор, ИЕ/мл | Индуцированная мокрота     | 0,44 (0,14-0,55)         | 0,41 (0,05-0,55)     | <b>0,042</b>  |
|   | Бронхиальные смывы         | 0,132 (0,124 – 0,281)    | 0,033 (0,02 – 0,23)  | <b>0,0134</b> |

*Примечание: n – количество пациентов; p–статистическая значимость различий;*

При проведении дискриминантного анализа было показано, что функциональной активности эластазы и альфа-1 протеиназного ингибитора в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте принадлежит доминантная роль в развитии ХОБЛ и формировании различий между группами исследуемых пациентов (табл. 5).

**Таблица 5**

**Данные дискриминантного анализа биохимических маркеров в  
индуцированной мокроте и бронхиальных смывах у «здоровых»  
курильщиков и курильщиков с хронической обструктивной болезнью  
легких**

| Показатели                               | Группа сравнения<br>n=32   | ХОБЛ<br>n=83 |
|--|--|--------------|
| Правильность классификации, %            | 87,6   | 82,4         |
| Включенные в уравнение ЛДФ биохимические | Активность эластазы в БС и ИМ, нмоль БАНЭ мин/мл;<br>$\lambda = 0,75; p < 0,001$ |              |

|   |   |
|---|---|
| параметры, $\lambda$ Уилкса и статистическая значимость | Активность альфа-1 протеиназного ингибитора в БС и ИМ, ИЕ/мл;<br>$\lambda=0,62$ ; $p<0,001$ |
| Характеристика уравнения ЛДФ                            | $\lambda=0,55$ ; $F=42,23$ ; $p<0,0001$   |

*Примечание: n – количество пациентов; ЛДФ – линейная дискриминантная функция; БС – бронхиальные смывы; ИМ – индуцированная мокрота;*

**Резюме.** Биохимический анализ ИМ и БС в исследуемых группах отчетливо отражает дисбаланс в протеиназ-антипротеиназной системе дыхательных путей, что проявляется в основной группе увеличением активности эластазы на фоне снижения активности альфа-1 протеиназного ингибитора. Дискриминантный анализ установил значимую роль исследуемых биохимических показателей в формировании структурных изменений бронхиальной стенки у курильщиков с ХОБЛ.

### **3.3. Клеточные маркеры в бронхиальном содержимом у лиц группы сравнения и при хронической обструктивной болезни легких**

#### **3.3.1. Цитологическое исследование индуцированной мокроты в группе сравнения и при хронической обструктивной болезни легких.**

Цитологический анализ ИМ у курильщиков с ХОБЛ показал статистически значимое ( $p<0,001$ ) повышение цитоза в исследуемой биологической жидкости по сравнению с группой «здоровых» курильщиков преимущественно за счет нейтрофильных лейкоцитов —  $1,48 (0,99-2,02) \times 10^6/\text{мл}$ . против  $0,56 (0,12-0,90) \times 10^6/\text{мл}$  соответственно. Курильщики с обструктивной болезнью легких отличались от «здоровых» курильщиков более высоким абсолютным числом лимфоцитов и бронхиальных эпителиоцитов с признаками дистрофии (БЭСДМ). Увеличение абсолютного числа эпителиальных клеток с признаками дистрофии в ИМ пациентов основной группы может быть связано с нарушением кровоснабжения слизистой оболочки бронхов, сопровождающимся избыточной деструкцией эпителиоцитов и повышением их числа в бронхиальной слизи [3, 157, 247, 248, 249].

В тоже время, нами обнаружено статистически значимое ( $p=0,001$ ) снижение относительного и абсолютного количества МФ в ИМ у курильщиков с ХОБЛ по сравнению со «здоровыми» курильщиками [35]. Данная морфологическая особенность цитогаммы ИМ в основной группе связана с перераспределением клеточных популяций и увеличением доли нейтрофилов (табл. 6).

Таблица 6

**Цитологические показатели индуцированной мокроты в группе сравнения и у курильщиков с ХОБЛ, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )**

| Исследуемые параметры в ИМ, (в % отношении/ количество $\times 10^6$ /мл) | Группа сравнения, n=32    | ХОБЛ, n=83                | p            |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------|
| Цитоз   | 1,59 (1,20-1,80)          | 2,34 (1,80-2,60)          | <b>0,001</b> |
| БЭСДМ   | 2,43 (1,60-2,80)          | 3,47 (1,60-4,85)          | 0,28         |
|   | 0,04 (0,02-0,06)          | 0,08 (0,03-0,12)          | <b>0,021</b> |
| Макрофаги   | <u>52,50 (33,66-68,3)</u> | <u>23,01 (6,90-37,33)</u> | <b>0,001</b> |
|   | 0,77 (0,54-0,93)          | 0,50 (0,15-0,75)          | <b>0,008</b> |
| Лимфоциты   | 10,06 (6,50-12,6)         | <u>10,18 (6,47-13,20)</u> | 0,97         |
|   | 0,16 (0,12-0,22)          | 0,22 (0,15-0,29)          | <b>0,022</b> |
| Нейтрофилы  | 32,98 (18,9-41,58)        | <u>61,33 (46,57-80,9)</u> | <b>0,001</b> |
|   | 0,56 (0,12-0,90)          | 1,48 (0,99-2,02)          | <b>0,000</b> |
| Эозинофилы  | <u>2,26 (0-2,80)</u>      | <u>1,59 (0,20-1,68)</u>   | 0,85         |
|   | 0,03 (0-0,05)             | 0,03 (0 - 0,04)           | 0,8          |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий; в числителе – относительное число клеточных популяций в индуцированной мокроте; в знаменателе – абсолютное число клеточных популяций в индуцированной мокроте;*

**3.3.2. Цитологическое исследование бронхиальных смывов в группе сравнения и при ХОБЛ.**

При цитологическом исследовании бронхиальных смывов (БС) нами обнаружены некоторые статистически значимые различия между клеточными

параметрами у курильщиков группы сравнения и группы ХОБЛ. Обращает на себя внимание статистически значимое ( $p=0,000003$ ) увеличение нейтрофилов в БС у пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой сравнения. По результатам исследования имеет место тенденция к повышению абсолютного количества макрофагов в БС у «здоровых» курильщиков по сравнению с группой курильщиков с ХОБЛ, однако статистически достоверный результат ( $p=0,0003$ ) был получен только в относительных значениях (табл. 7). Нами отмечена тенденция к увеличению абсолютного количества лимфоцитов у исследуемых основной группы по сравнению со «здоровыми» курильщиками (медиана данного клеточного показателя в группе ХОБЛ выше в 1,78 раз). При цитологическом анализе бронхиальных смывов у пациентов с ХОБЛ установлено статистически значимое ( $p=0,003$ ) снижение эпителиоцитов обычного строения по сравнению с группой курильщиков без ХОБЛ. Этот факт косвенно указывает на преобладание дистрофических процессов в слизистой оболочке бронхов и повышенную экфолиацию эпителиального пласта, который попадает в лаважную жидкость.

Таким образом, изменения в цитограммах БС и ИМ имеют общие черты, позволяющие четко дифференцировать исследуемые группы. Важно отметить, что цитологические показатели ИМ являются интегральными признаками, отражающими морфологическое состояние всех отделов дыхательной системы. Обнаруженные нами изменения при цитологическом исследовании бронхиального содержимого в группе ХОБЛ и у «здоровых» курильщиков свидетельствуют о дисбалансе в системе иммунного ответа с развитием воспалительных и дистрофических процессов в бронхиальной стенке.

Полученные нами данные подтверждают результаты исследований ряда авторов [20, 21, 32, 35, 36, 157, 265]

**Таблица 7**

**Цитологические показатели бронхиальных смывов у пациентов группы сравнения и с ХОБЛ.**

| Показатель | Единица измерения | Группа сравнения, | ХОБЛ, n =83 | Уровень значимости |
|------------|-------------------|-------------------|-------------|--------------------|
|------------|-------------------|-------------------|-------------|--------------------|

|  |   | n =32                    |                       | различий<br>(p) |
|--|---|--------------------------|-----------------------|-----------------|
| цитоз  | Клеток на 10 <sup>6</sup> /мл                     | 1,75 (1,6-2,1)           | 2,2 (1,5-3,2)         | 0,097           |
| БОЭСЛ<br>(бронхиальный<br>эпителий<br>обычного<br>строения)      | Относительное<br>число клеточных<br>популяций - % | 21,7<br>(14,49 – 23,5)   | 11,3 (6,8 – 20,8)     | <b>0,003</b>    |
|  | Абсолютное число<br>- клеток на 10 <sup>6</sup>   | 0,23<br>(0,1373 – 0,29)  | 0,24 (0,15 – 0,32)    | 0,74            |
| БЭСДЛ<br>(бронхиальный<br>эпителий с<br>признаками<br>дистрофии) | Относительное<br>число клеточных<br>популяций - % | 4,615<br>(3,95 – 5,99)   | 4,2 (2,8 – 6,0)       | 0,14            |
|  | Абсолютное число<br>- клеток на 10 <sup>6</sup>   | 0,06<br>(0,0596 - 0,087) | 0,08 (0,05 – 0,15)    | 0,19            |
| БКЛ<br>(бокаловидные<br>клетки)                                  | Относительное<br>число клеточных<br>популяций - % | 6,2 (3,2 – 7,2)          | 5,7 (3,4 – 8,5)       | 0,73            |
|  | Абсолютное число<br>- клеток на 10 <sup>6</sup>   | 0,27<br>(0,11712 – 0,44) | 0,24 (0,12 – 0,24)    | 0,26            |
| МКЛ<br>(макрофаги)   | Относительное<br>число клеточных<br>популяций - % | 36,8<br>(31,2 -48,965)   | 14,62<br>(5,6 – 30,8) | <b>0,000</b>    |
|  | Абсолютное число<br>- клеток на 10 <sup>6</sup>   | 0,19<br>(0,095 – 1,001)  | 0,14<br>(0,06 - 0,23) | 0,067           |
| ЛФН<br>(лимфоциты)   | Относительное<br>число клеточных<br>популяций - % | 8,2 (7,2 – 9,8)          | 8,5 (6,3 – 11,4)      | 0,9             |
|  | Абсолютное число<br>- клеток на 10 <sup>6</sup>   | 0,355<br>(0,164 – 0,58)  | 0,2 (0,14 – 0,38)     | 0,081           |
| НФЛ<br>(нейтрофилы)  | Относительное<br>число клеточных<br>популяций - % | 29,3<br>(17,545 – 32,4)  | 47,5<br>(36,8 – 68,1) | <b>0,000</b>    |
|  | Абсолютное число<br>- клеток на 10 <sup>6</sup>   | 0,27<br>(0,191 - 0,39)   | 0,75<br>(0,37 – 2,09) | <b>0,000003</b> |
| ЭФЛ  | Относительное                                     | 1,35 (0,0 – 2,1)         | 1,44 (0 – 2,25)       | 0,62            |



|              |                                     |                          |                       |       |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------|-------|
| (эозинофилы) | число клеточных популяций - %       |                          |                       |       |
|              | Абсолютное число - клеток на $10^6$ | 0,175<br>(0,049 – 0,205) | 0,09<br>(0,03 – 0,17) | 0,102 |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий;*

Дискриминантный анализ показал, что обследованные нами лица значительно отличались друг от друга по цитологическим показателям бронхиальной слизи, полученной путем смывов со слизистой оболочки бронхов и методом индуцированного мокрототделения. Эти данные свидетельствуют о ведущем значении подсчета количества макрофагов, нейтрофилов, бронхиальных эпителиоцитов обычного строения в БС и ИМ для выявления маркеров формирования ХОБЛ у исследуемых пациентов (табл. 8).

**Таблица 8**

**Данные дискриминантного анализа клеточных маркеров в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте у «здоровых» курильщиков и курильщиков с ХОБЛ**

| Показатели   | Группа сравнения<br>n=32  | ХОБЛ<br>n=83 |
|--|---|--------------|
| Правильность классификации, %  | 89,5  | 98,7         |
| Включенные в уравнение ЛДФ клеточные параметры, $\lambda$ Уилкса и статистическая значимость | Абсолютное количество МФ $\times 10^6$ /мл в БС и ИМ;<br>$\lambda=0,76$ ; $p<0,001$ |              |
|  | Абсолютное количество НФ $\times 10^6$ /мл в БС и ИМ;<br>$\lambda=0,73$ ; $p<0,001$ |              |
|  | Абсолютное количество БЭСД $\times 10^6$ /мл в БС и ИМ; $\lambda=0,52$ ; $p<0,001$  |              |
| Характеристика уравнения ЛДФ   | $\lambda=0,49$ ; $F= 68,94$ ; $p<0,0001$  |              |

*Примечание: n – количество пациентов; ЛДФ – линейная дискриминантная функция; БС – бронхиальные смывы; ИМ – индуцированная мокрота; МФ – макрофаги; НФ – нейтрофилы; БЭСД – бронхиальные эпителиоциты с признаками дистрофии.*

**Резюме:** при цитологическом исследовании в группе ХОБЛ и группе сравнения были получены статистически значимые различия по ряду показателей,

при этом изменения в цитограммах БС и ИМ имеют общие черты, позволяющие четко дифференцировать исследуемые группы. Более высокая клеточность ИМ при ХОБЛ связана с нейтрофильными лейкоцитами, лимфоцитами, бронхиальными эпителиоцитами с признаками дистрофии.

При исследовании БС курильщиков с ХОБЛ по сравнению со «здоровыми» курильщиками в цитологической картине были получены сходные изменения – увеличение общего числа нейтрофилов, лимфоцитов и снижение абсолютного количества макрофагов.

При проведении дискриминантного анализа установлено, что ведущее значение в формировании ХОБЛ при длительном курении принадлежит клеточному дисбалансу, проявляющегося повышением абсолютного и относительного содержания нейтрофилов, уменьшением относительного содержания макрофагов в ИМ и БС, что приводит к структурным изменениям СОБ в виде увеличения бронхиального эпителия с признаками дистрофии.

### **3.4. Тканевые, клеточные и молекулярные факторы развития хронической обструктивной болезни легких**

Современные представления относительно патоморфологических и патофизиологических критериев резистентности к формированию ХОБЛ под влиянием курения являются неполными и в ряде случаев противоречивыми. В настоящее время окончательно не выявлены механизмы, объясняющие развитие ХОБЛ только у 50% курильщиков, и нет достоверных морфологических маркеров, которые можно было бы использовать в качестве предикторов развития заболевания.

В этой связи отсутствует таргетное воздействие на патофизиологические звенья формирования болезни, что способствует неуклонному прогрессированию ХОБЛ.

Возможно, патогенетическая основа гетерогенности морфологических изменений в бронхиальной стенке лежит в структурном изменении слизистой оболочки бронхов, детальный анализ которой является предметом настоящего исследования.

Выявлению тканевых, клеточных и молекулярных механизмов резистентности к формированию ХОБЛ, а также оценке морфологического базиса неуклонного прогрессирования этого заболевания посвящен данный раздел работы.

#### **3.4.1. Бронхоскопическое исследование слизистой оболочки бронхов у курильщиков без клинических признаков ХОБЛ и у пациентов с ХОБЛ**

При бронхоскопическом исследовании у курильщиков без ХОБЛ регистрировались изменения слизистой оболочки бронхиального дерева. У этой группы лиц в слизистой оболочке бронхов определялись очаговые изменения, в том числе и полнокровие сосудов, которое отражает изменение гемодинамики сосудов микроциркуляторного русла бронхов при проведении бронхоскопического исследования. Слизистая оболочка среднедолевого бронха у этой группы пациентов гиперемирована, складки сосудистого рисунка сглажены, в просвете обнаруживалось небольшое количество бронхиальной слизи. На основании бронхоскопического исследования у некоторых пациентов этой группы констатировался очаговый, нисходящий, катаральный эндобронхит.

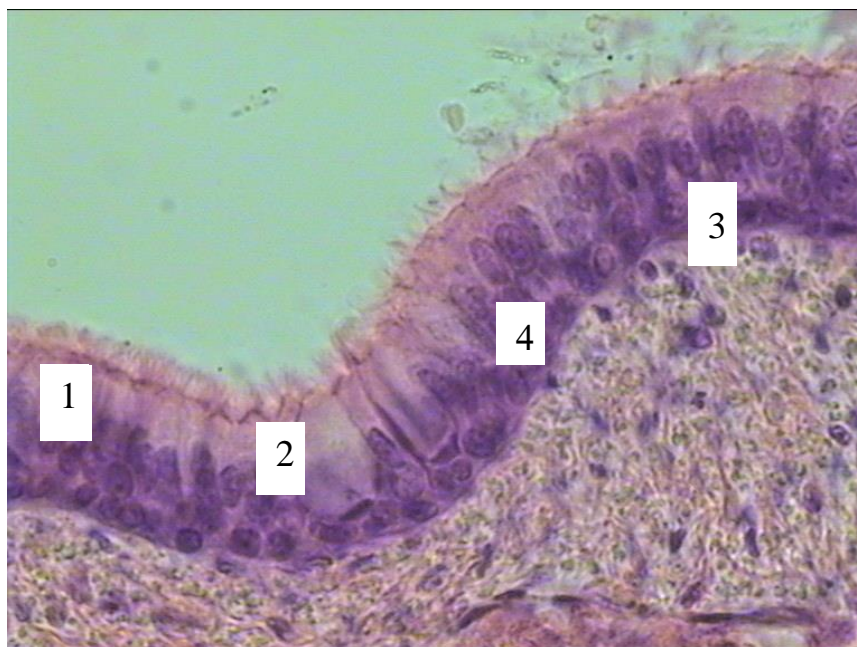
При визуализации бронхиальной стенки у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких определялись бронхоскопические признаки диффузного воспаления, нередко сочетающиеся с фиброзными и рубцовыми деформациями бронхиальной стенки. Согласно данным бронхоскопического исследования в 85,3 % случаев у этой группы пациентов протоколировался хронический фиброзный, а в 14,7 % - атрофический бронхит.

##### **3.4.1.1. Морфофункциональные особенности бронхобиоптатов у курильщиков без клинических признаков ХОБЛ**

Данные световой и электронной микроскопии выявили очаговые изменения слизистой оболочки бронхов у курильщиков без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких.

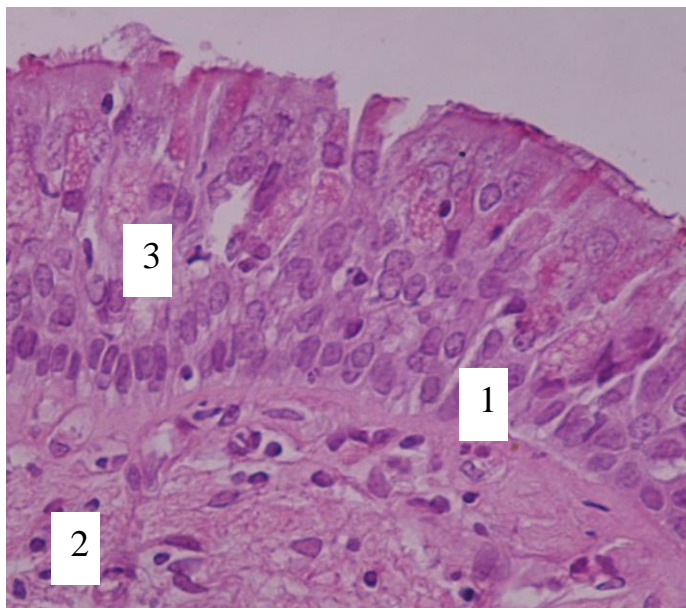
*Светооптически* у курильщиков без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких эпителиальный пласт представлен однослойным многорядным призматическим реснитчатым эпителием.

В нем определялись следующие типы эпителиоцитов: реснитчатые, бокаловидные, низкие и высокие вставочные. Последние можно назвать базальными клетками (камбиальные элементы бронхов), так как при своем размножении они могут давать начало реснитчатым и бокаловидным клеткам (рис. 5).



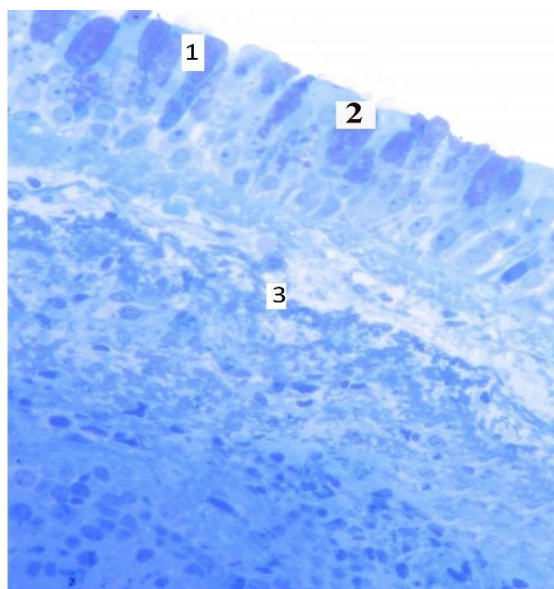
*Рисунок 5. Бронхобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Реснитчатые (1), бокаловидные (2), низкие (3) и высокие вставочные клетки (4). Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 450*

У этой группы пациентов межэпителиальный отек слизистой оболочки бронхов сочетался с появлением единичных реснитчатых эпителиоцитах с дистрофическими нарушениями как цитоплазмы (деструкция и отсутствие ресничек на апикальной части, грубая базофильная зернистость и множественная ее вакуолизация), так и ядра (компактная, пикнотичная структура хроматина в ядре) (рис. 6).



**Рисунок 6.** *Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Межэпителиальный (1), субэпителиальный (2) отек, реснитчатые эпителиоциты с признаками дистрофии (3). Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 650*

В некоторых участках СОБ определялась очаговая бокаловидноклеточная гиперплазия с выраженными признаками гиперсекреции слизи (рис. 7).

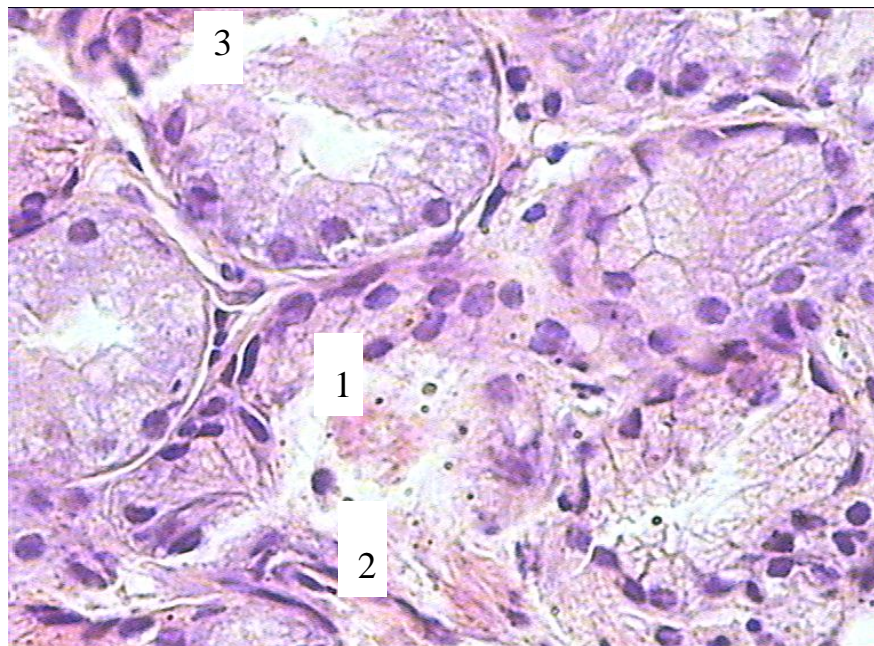


**Рисунок 7.** *Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Реснитчатые эпителиоциты с признаками дистрофии (1), гипертрофия бокаловидных экзокриноцитов (2), субэпителиальный отек (3). Полутонкий срез, окраска азуром-II. Ув. 400*

Структурные изменения бронхиального эпителия у обследованных лиц нередко сочетались с расширением концевых отделов белково-слизистых желез

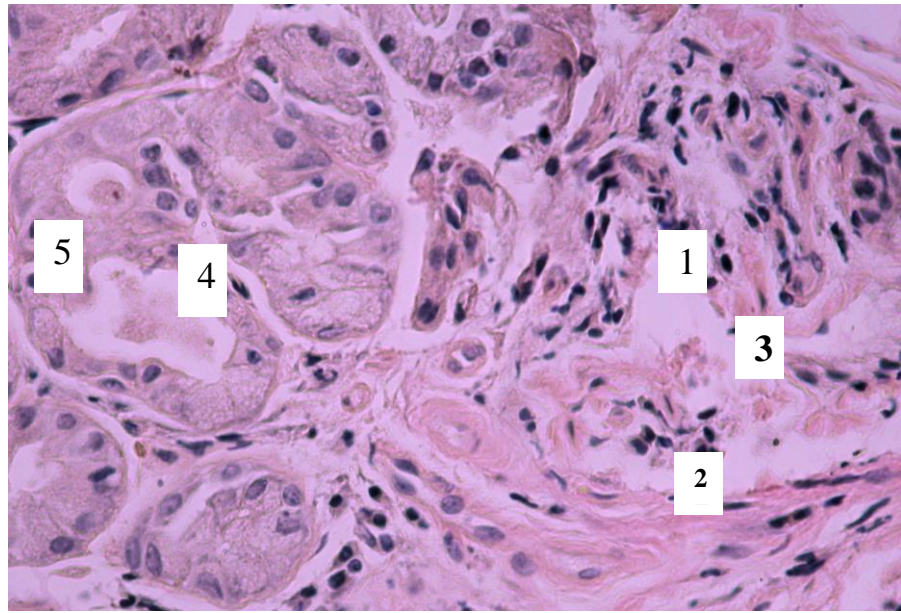


собственной пластинки слизистой оболочки бронхов с морфологическими признаками гиперсекреции слизи в мукоцитах и дистрофией сероцитов (рис. 8).



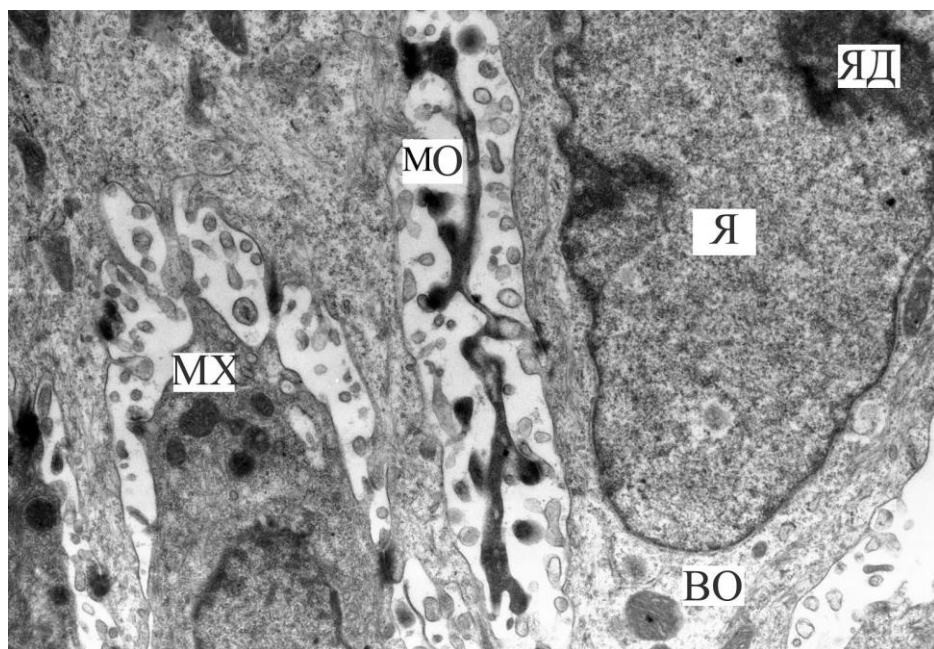
*Рисунок 8. Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Расширение конечных отделов белково-слизистых желез (1), гиперсекреция слизи (2), дистрофические изменения серозных glandулоцитов (3). Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 650*

Микроциркуляторное русло бронхиальной стенки у курильщиков без клинических признаков ХОБЛ характеризовалось венозным полнокровием, стазом, в некоторых случаях визуализировался периваскулярный и межжелезистый отеки. Данные морфологические изменения, наблюдаемые нами в слизистой оболочке бронхов обследованных пациентов, сочетались с появлением умеренного очагового полиморфноклеточного инфильтрата и единичными нейтрофильными лейкоцитами (рис. 9).



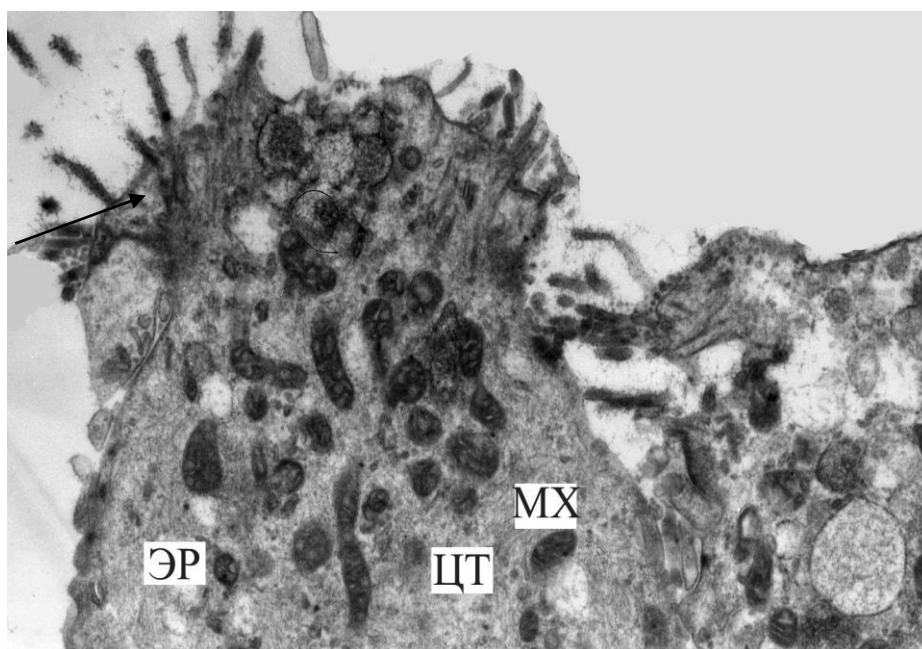
**Рисунок 9.** Бронхобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Лимфоплазмоцитарный инфильтрат (1) с единичными нейтрофилами (2), периваскулярный (3) и межжелезистый (4) отек, дистрофия серозных glandулоцитов (5). Ув. 400

**Электронно-микроскопическое исследование** бронхобиоптатов у курильщиков без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких установило увеличение и расширение эпителиального пласта за счет внутри- и межэпителиального отеков. В пространствах между эпителиоцитами нередко визуализировались множественные цитоплазматические «мостики» (рис. 10).



**Рисунок 10.** Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Выраженный межэпителиальный (МО) и внутриклеточный отеки (ВО). Я – ядро. ЯД – ядрышко. МХ – митохондрии. Ув. 17200

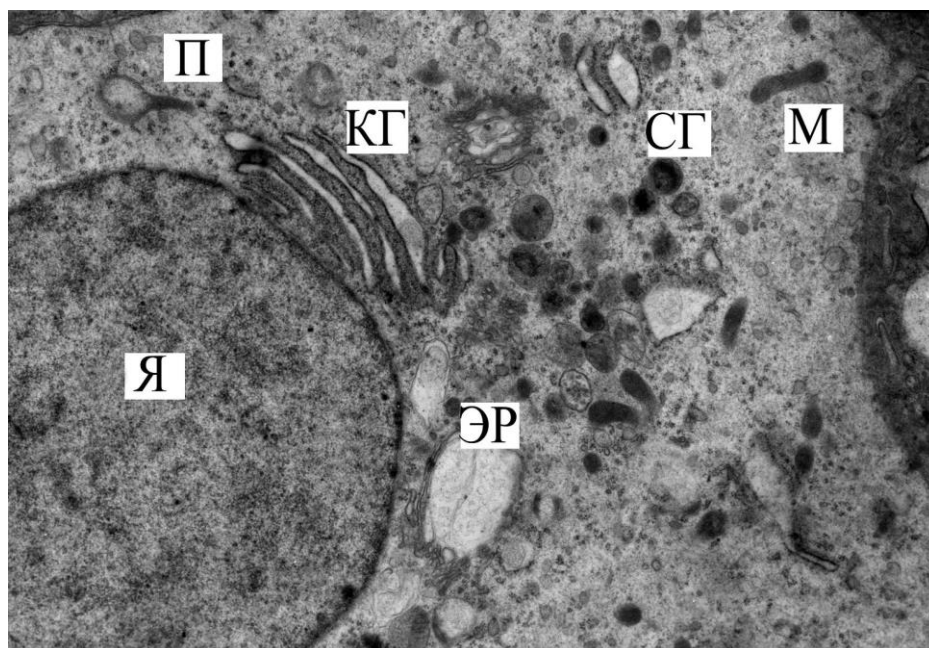
В некоторых клетках реснитчатого эпителия на апикальной поверхности определяется множество микроворсинок с большим количеством мелких цитоплазматических выростов и компактным скоплением большого количества частично деструктивных митохондрий и единичных цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума (рис. 11).



**Рисунок 11.** Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Участок реснитчатого эпителиоцита. Небольшие выросты цитоплазмы. Множественные мелкие вакуоли в цистернах эндоплазматического ретикулума (ЭР) и в митохондриях (МХ). ЦТ – цитоплазма. Ув. 24000

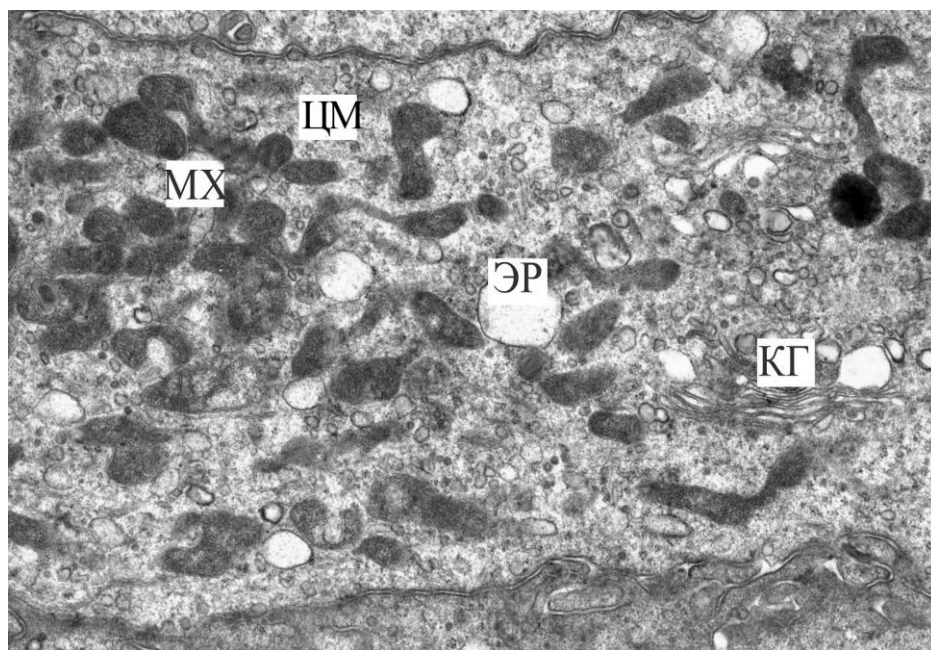
Нередко при ультраструктурном исследовании бронхиобиоптатов в этой группе пациентов визуализировались реснитчатые эпителиоциты с высокой электронной плотностью цитоплазмы, в ней определялись увеличенные в объеме цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума с множественными рибосомами и полисомами. Диктиосомы пластинчатого комплекса Гольджи в этих бронхиальных эпителиоцитах гиперплазированны (рис. 12).





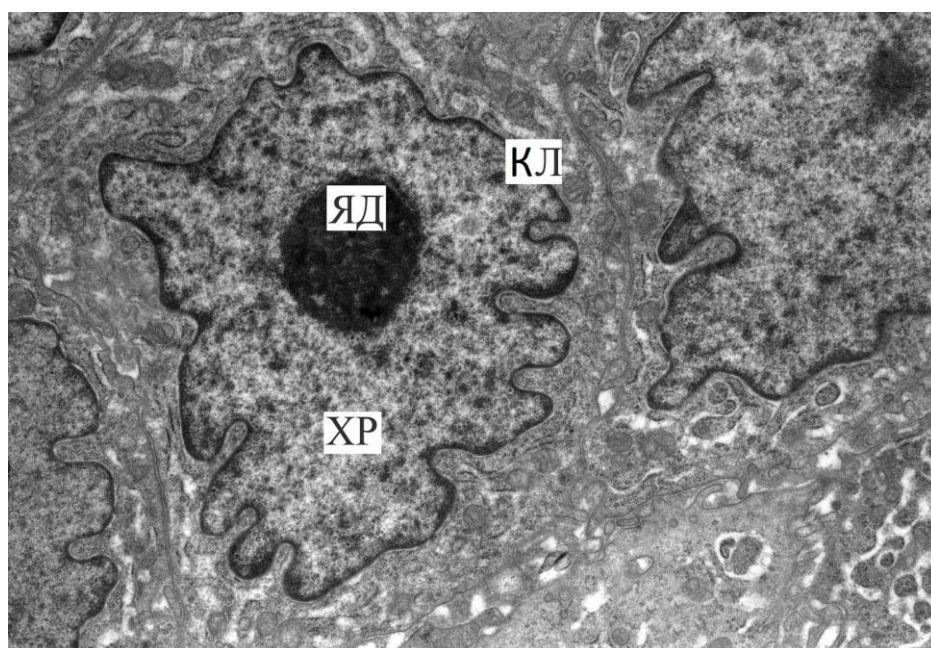
*Рисунок 12. Бронхиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Участок реснитчатого эпителиоцита. Я – ядро. МХ – митохондрии. Увеличение цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭР), расширение диктиосом пластинчатого комплекса Гольджи (КГ) с многочисленными осмиофильными секреторными гранулами (СГ), множественные полисомы (П). Ув. 17000*

У ряда курильщиков без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких цитоплазма реснитчатых эпителиоцитов характеризовалась измененными осмиофильными свойствами с участками просветления и вакуолизации (рис. 13).



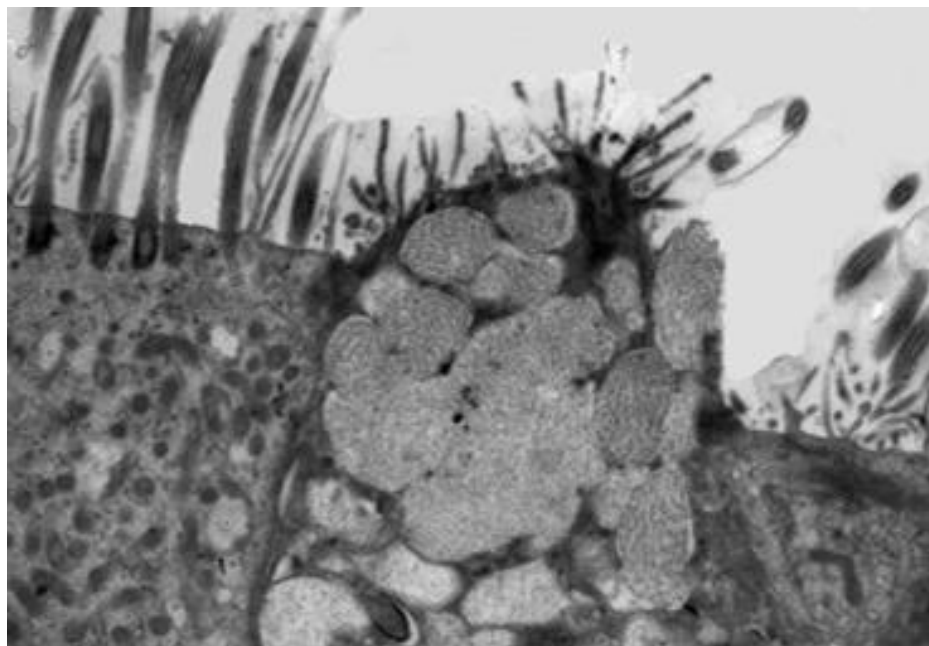
*Рисунок 13. Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Участок реснитчатого эпителиоцита. Незначительное просветление цитоплазматического матрикса (ЦМ). Крупные вакуоли в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и в пластинчатом комплексе Гольджи (КГ). Митохондрии (МХ). Ув. 24000*

Генетический материал в ядрах некоторых эпителиальных клеток бронхиальной стенки представлен мелкодисперсной структурной хроматина (эухроматин). Также можно выявить крупные ядрышки с выраженным глобулярным компонентом. Ядра некоторых клеток формируют многочисленные инвагинаты кариолеммы с выраженной конденсацией хроматина (рис. 14).



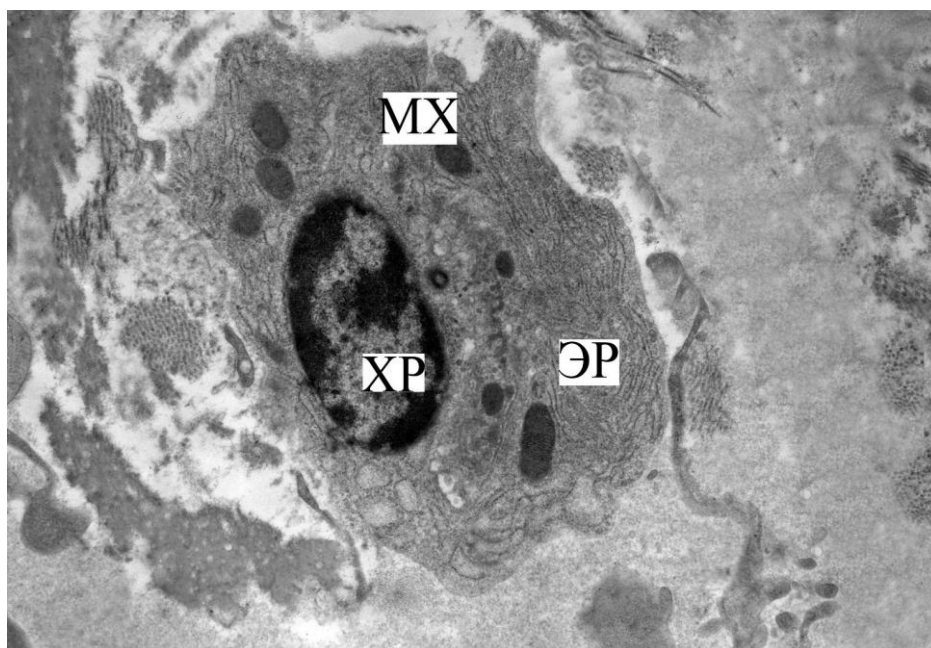
**Рисунок 14.** *Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Участок реснитчатого эпителиоцита. Ядрышко (ЯД). Кариолема (КЛ). Сетчатая, мелкодисперсная структура хроматина (ХР). Ув. 17000*

В данной группе пациентов бокаловидные экзокриноциты расширены в объеме, в их цитоплазме определялись множественные, электронно-прозрачные, плотно упакованные гетерогенные везикулы слизистого секрета, нередко с ультраструктурными признаками экстррузии (рис. 15).



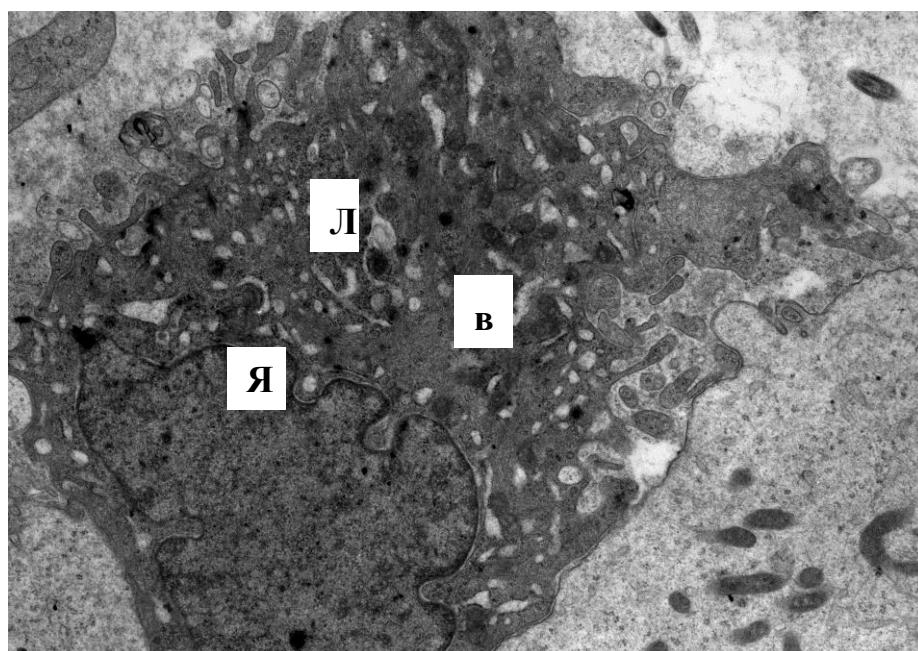
**Рисунок 15.** *Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Бокаловидный экзокриноцит. Крупные везикулы слизистого секрета. Ув. 17000*

В строме слизистой оболочки бронхов у курильщиков без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких выявлялись множественные отеки с макрофагами, лимфоцитами, плазмócитами. В последних визуализировались цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума (рис. 16).



*Рисунок 16. Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Плазматическая клетка. МХ – митохондрии. ХР – хроматин. ЭР – расширенные цистерны эндоплазматического ретикулума. Ув. 14000*

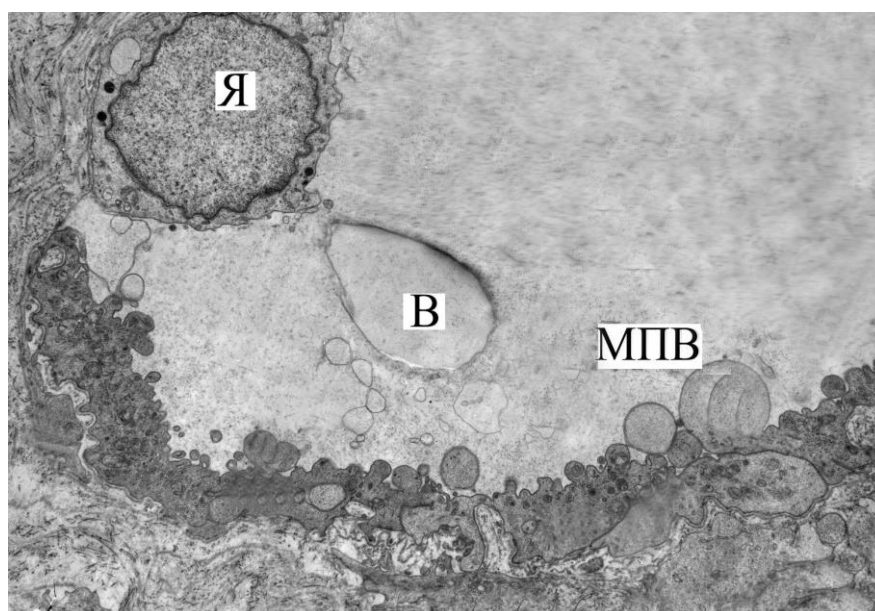
При ультраструктурном анализе гистео-макрофагальных клеточных элементов в бронхиальной стенке у курильщиков без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких нами выявлены две популяции клеток – моноцитарного и фагоцитирующего фенотипа. Последние характеризовались множественными фаголизосомами, митохондриями и расширенными цистернами эндоплазматического ретикулума в цитоплазме, ассиметрично расположенным ядром с инвагинациями кариолеммы (рис. 17).





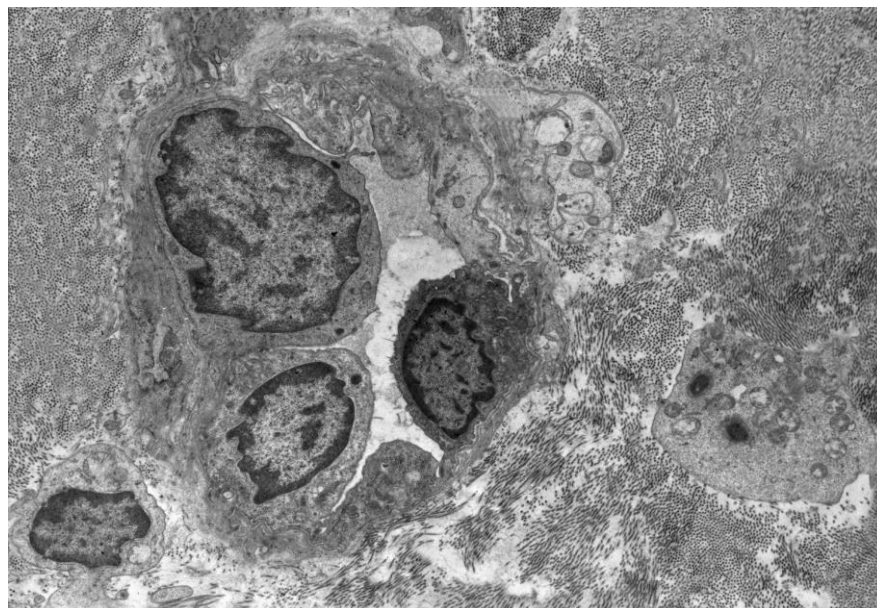
**Рисунок 17.** Бронхиобиптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Макрофагальная клетка фагоцитирующего фенотипа. Развитые гетерофаголизосомы (Л). Многочисленные электронно-прозрачные вакуоли (В). Инвагинации ядра (Я) Ув. 17000.

В собственной пластинке слизистой оболочки бронхов у курильщиков без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких сосуды микроциркуляторного русла образованны в основном «открытыми» капиллярами. Они отличались широким просветом с многочисленными вакуолями, которые формируются по типу клазматоза люминальной поверхности эндотелиоцитов с электронно-плотными конгломератами внутри них (рис. 18).



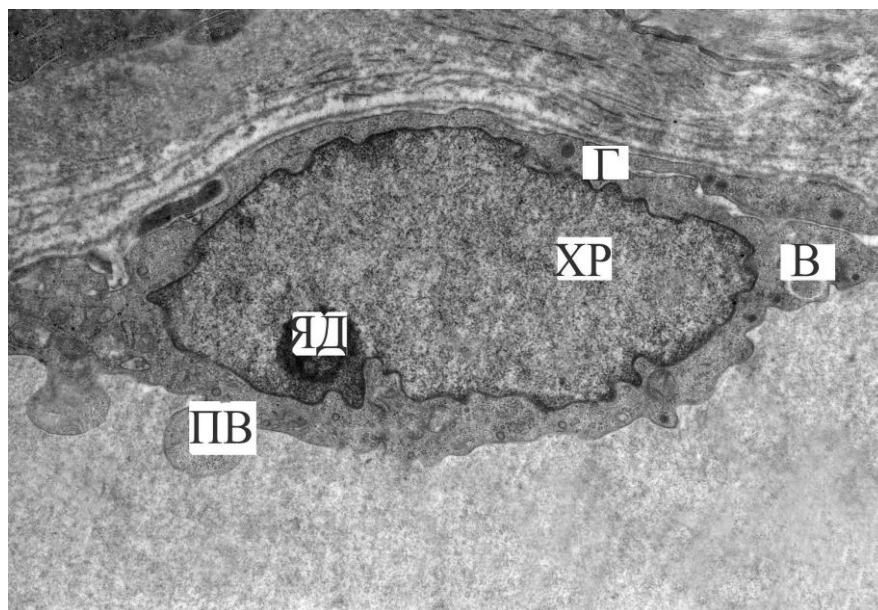
**Рисунок 18.** Бронхиобиптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Участок капилляра в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов. Я – ядро. Неровности люминальной поверхности эндотелиоцита с многочисленными гетерогенными вакуолями (В) и микропиноцитозными везикулами (МПВ). Ув. 8500

Популяция эндотелиальных клеток в сосудах микроциркуляторного русла собственной пластинки слизистой оболочки бронхов у обследованных лиц состоит, как минимум, из трех типов клеток – основных (типичных), светлых (отечных) и темных (гиперосмированных) (рис. 19). При этом в популяциях эндотелиоцитов капилляров слизистой оболочки бронхов преобладали основные (типичные) и светлые (отечные) клетки.



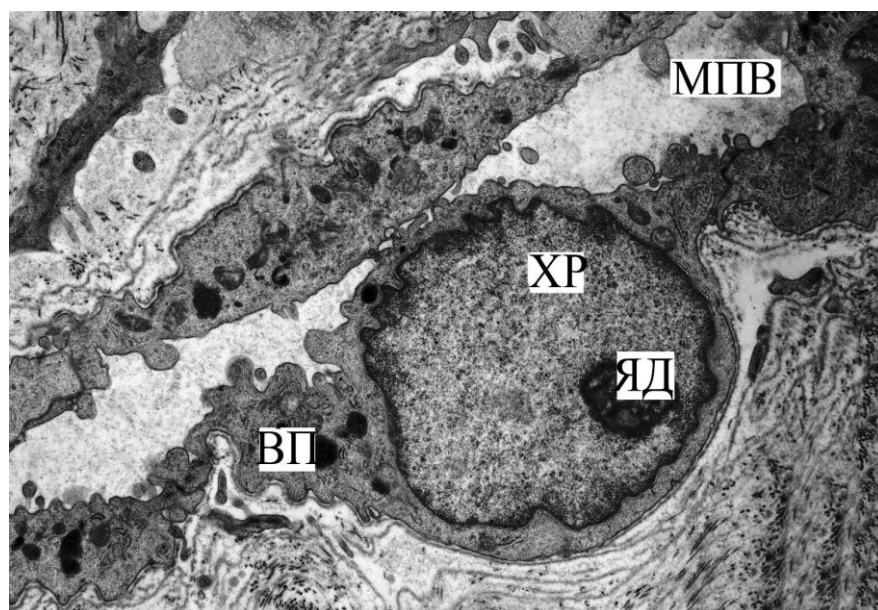
*Рисунок 19. Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Капилляр в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов. Неоднородность популяций эндотелиоцитов. Ув. 8500*

Люминальная поверхность как основных, так и светлых эндотелиальных клеток была с неровными контурами и признаками клазматоза, а также с множественными мелкими пиноцитозными инвагинациями. Цитоплазма эндотелиальных клеток содержала множество светлых полиморфных микропиноцитозных везикул. Ядра эндотелиоцитов неправильной или бобовидной формы с многочисленными выростами ядерной оболочки, маргинальной компактизацией хроматина. Нередко определялись признаки внутриклеточного отека (рис. 20). Данные изменения можно рассматривать как относительно обратимые в рамках адаптивной реакции на воздействие табачного дыма.



*Рисунок 20. Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Участок кровеносного капилляра. ХР – хроматин. ЯД – ядрышко. В – вакуоли. Г – гранулы. ПВ – пиноцитозные везикулы. Ув. 17000*

Цитоплазма «светлых» эндотелиоцитов сосудов микроциркуляторного русла бронхиальной стенки содержала единичные электронно-плотные секреторные гранулы Вейбеля – Паладе. Последние выявлялись, преимущественно, в безъядерной зоне, выглядели либо как вытянутые (удлиненные) образования с плотным фибриллярным содержимым или как мелкие, компактные цитоплазматические трубочки (рис. 21).



*Рисунок 21. Бронхиобиоптат курильщика без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких. Фрагмент кровеносного капилляра. Уменьшение диаметра капилляра. ЯД – ядрышко. ХР – хроматин. МПВ – микропиноцитозные везикулы. ВП – гранулы Вейбеля – Паладе. Ув. 14000*

### **3.4.1.2. Морфологическая характеристика слизистой оболочки бронхов у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких**

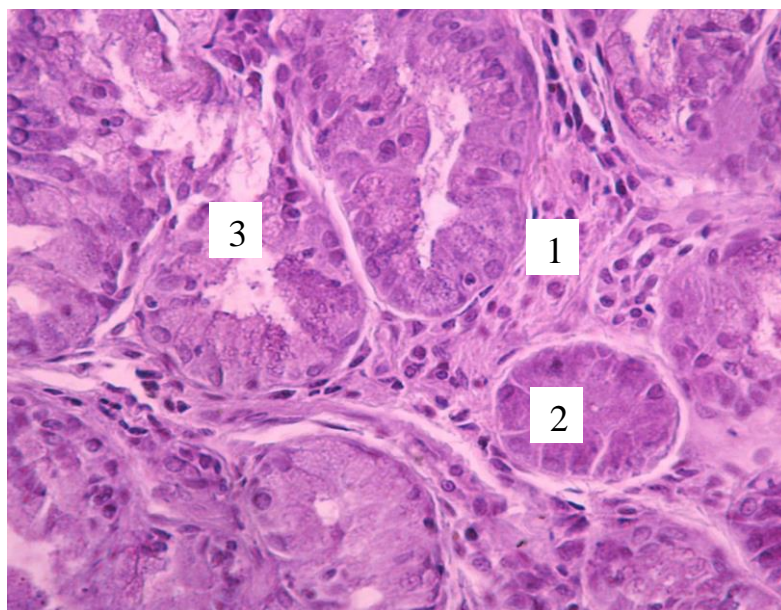
У пациентов с ХОБЛ в слизистой оболочке бронхов наблюдалась выраженная структурная дезорганизация эпителиального пласта с преобладанием дистрофических процессов над воспалительными изменениями.

Реснитчатые клетки у пациентов с ХОБЛ нередко уменьшены в размерах, с гетерогенной окраской и ядра, и цитоплазмы. Дистрофические нарушения в этих клетках формируются, в основном, в ядре (множественные инвагинаты кариолеммы, распад ядрышек, выраженная конденсация хроматина, кариопикноз). Цитоплазма реснитчатых эпителиоцитов была гетерогена и отличалась усиленной вакуолизацией с участками просветления или, напротив, активацией тинкториальных свойств с ее затемнением.

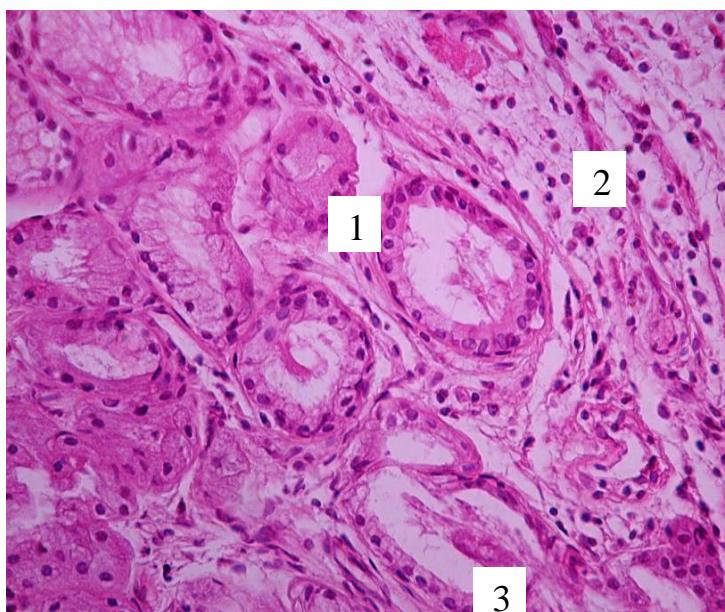
У большей части пациентов с ХОБЛ количество бокаловидных клеток по отношению к реснитчатым эпителиоцитам в слизистой оболочке бронхов снижено и составляло 1:6, 1:7.

Снижение функциональной активности бокаловидных клеток, наблюдаемое нами у обследованных пациентов, сопровождалось дистрофическими изменениями сероцитов и мукоцитов белково-слизистых желез. Подавление секреторной активности glanduloцитов белково-слизистых нашло свое отражение в их атрофии (рис. 22, 23).



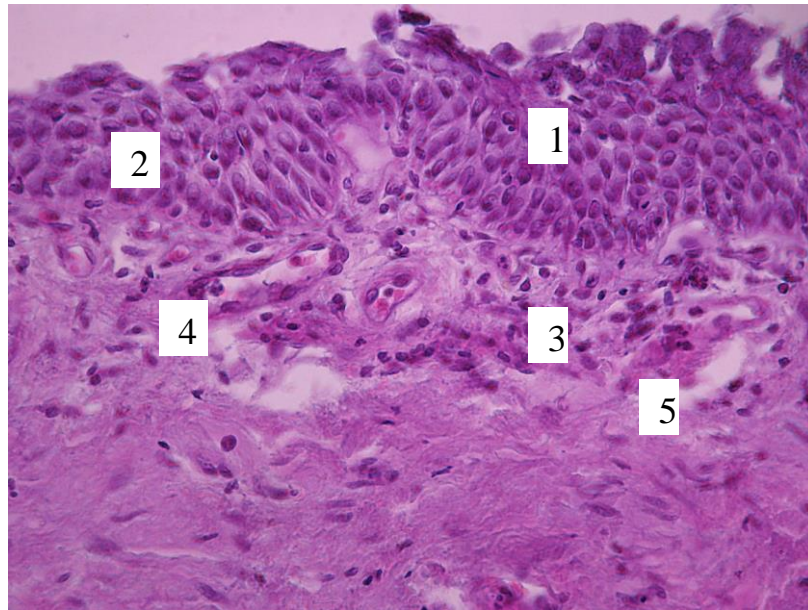


**Рисунок 22.** *Бронхобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Лимфо-плазмоцитарные инфильтраты (1), дистрофические изменения сероцитов (2) и мукоцитов (3). Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 350*



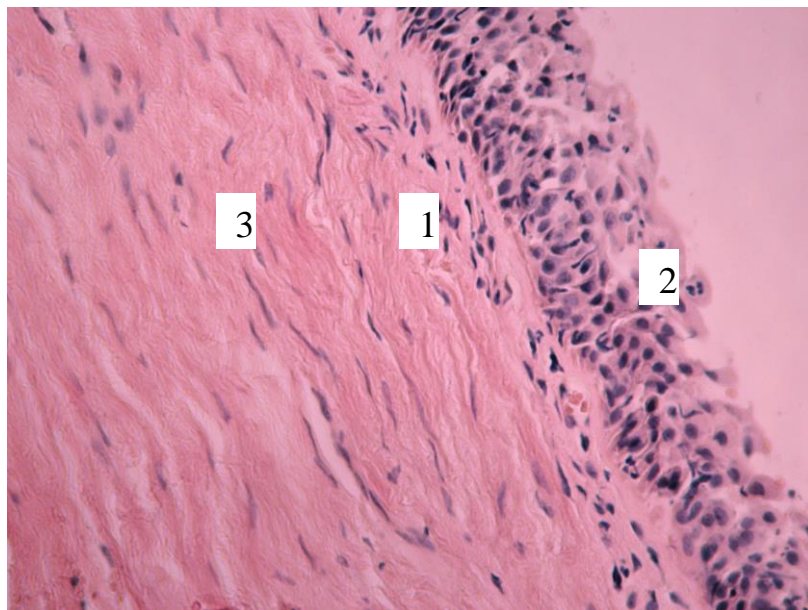
**Рисунок 23.** *Бронхобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Межжелезистый отек (1), диффузный лимфоплазмоцитарный инфильтрат (2), атрофия клеток выводных протоков (3). Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 350.*

При проведении морфологического исследования биоптатов слизистой оболочки бронхов у пациентов с ХОБЛ нами обнаружена очаговая плоскоклеточная метаплазия (12,2 %) (рис. 24).



**Рисунок 24.** Бронхобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Плоскоклеточная метаплазия (1). Внутриэпителиальная локализация нейтрофилов (2), субэпителиальная лимфоплазмоцитарная инфильтрация (3), расширение капилляров, периваскулярный отек (4), стаз и тромбоз сосудов (5). Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 350.

В собственной пластинке СОБ у пациентов с ХОБЛ определялся диффузный субэпителиальный полиморфно-клеточный инфильтрат с нейтрофильными гранулоцитами. В некоторых участках бронхиальной стенки отмечали единичные очаговые круглоклеточные инфильтраты (рис. 24, 25).



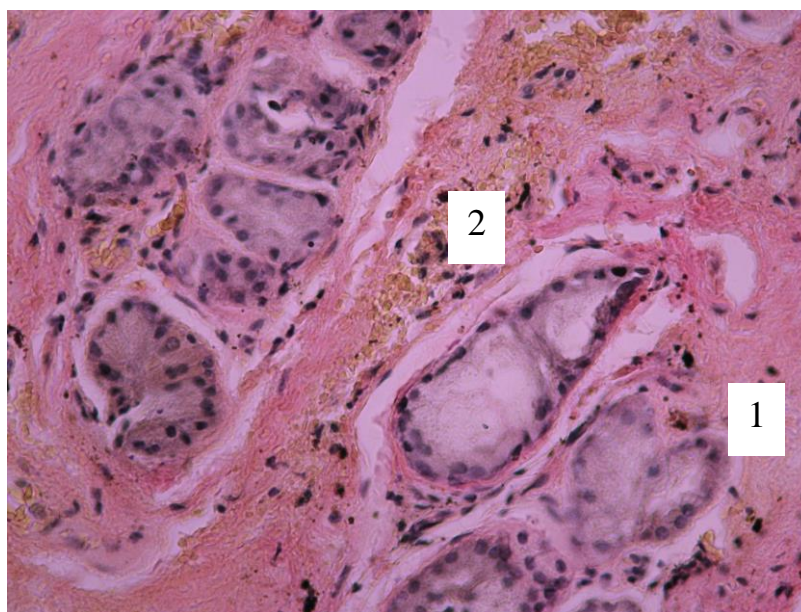
**Рисунок 25.** Бронхобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Диффузный полиморфноклеточный инфильтрат (1), межэпителиальная локализация



нейтрофилов (2), фиброз собственной пластинки слизистой оболочки бронхов (3). Окр. по методу Ван-Гизона. Ув. 250.

У большинства пациентов констатировали интраэпителиальную локализацию лимфоцитов и нейтрофилов (рис. 21).

У пациентов с данной формой болезни в собственной пластинке СОБ в 38,6 % случаев диагностировали умеренный, а в 61,4 % – выраженный фиброз (рис. 25, 26). Плотные коллагеновые волокна локализовались, преимущественно, в межжелезистой строме (рис. 26).

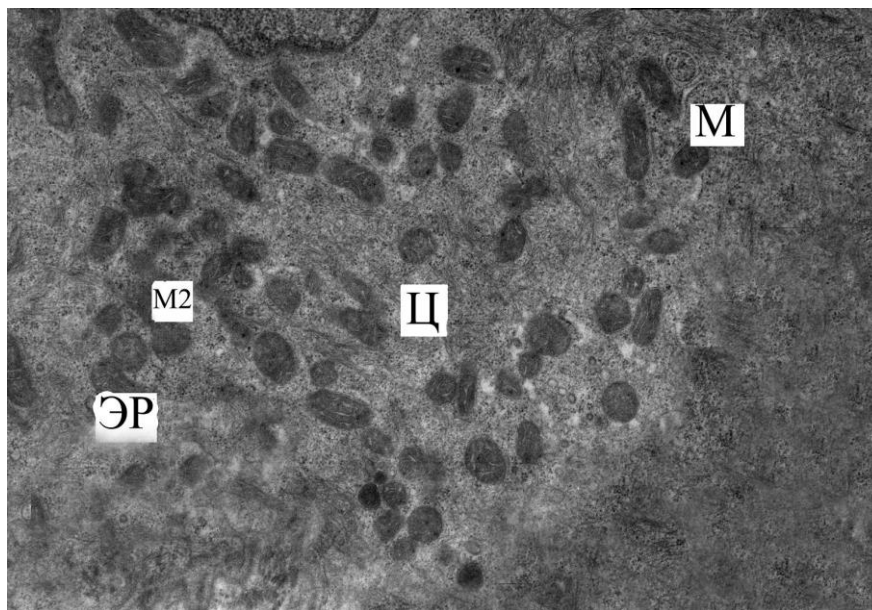


**Рисунок 26.** Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Фиброз межжелезистой стромы (1), очаги кровоизлияний в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов (2). Окр. по методу Ван-Гизона. Ув. 300.

У пациентов этой группы определялась гетерогенность сосудов микроциркуляторного русла. У части сосудов просвет уменьшен, в них обнаружены реалогические расстройства (стаз, сладж эритроцитов, тромбоз). Другие сосуды компенсаторно расширены, с признаками периваскулярных отеков (рис. 24).

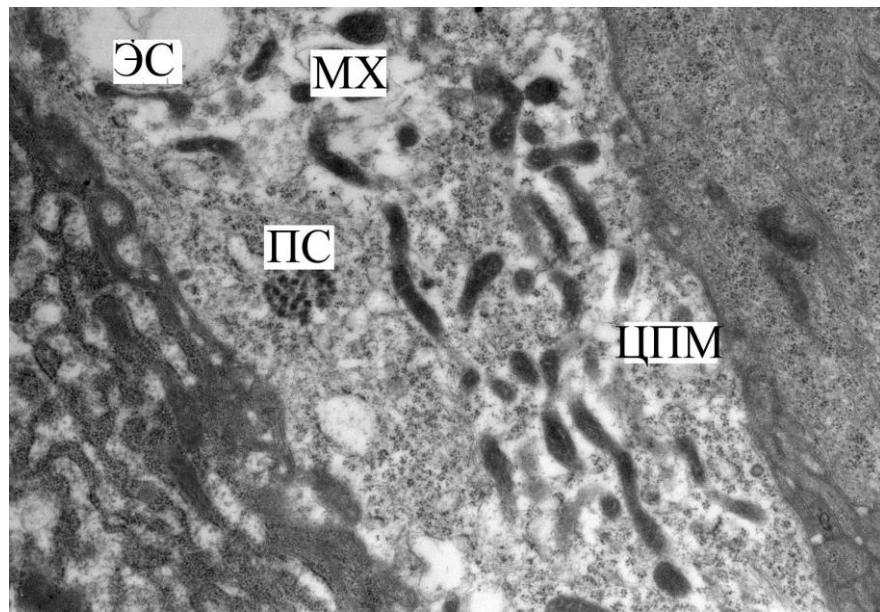
**При электронно-микроскопическом анализе** эпителиального пласта у пациентов с ХОБЛ определялось изменение электронно микроскопических характеристик всех внутриклеточных органелл.

В реснитчатых эпителиоцитах – дистрофические изменения цитоплазмы, увеличение, за счет вакуолизации, объема гранулярной эндоплазматической сети, электронно-плотные скопления из рибосом и полисом. (рис. 27).



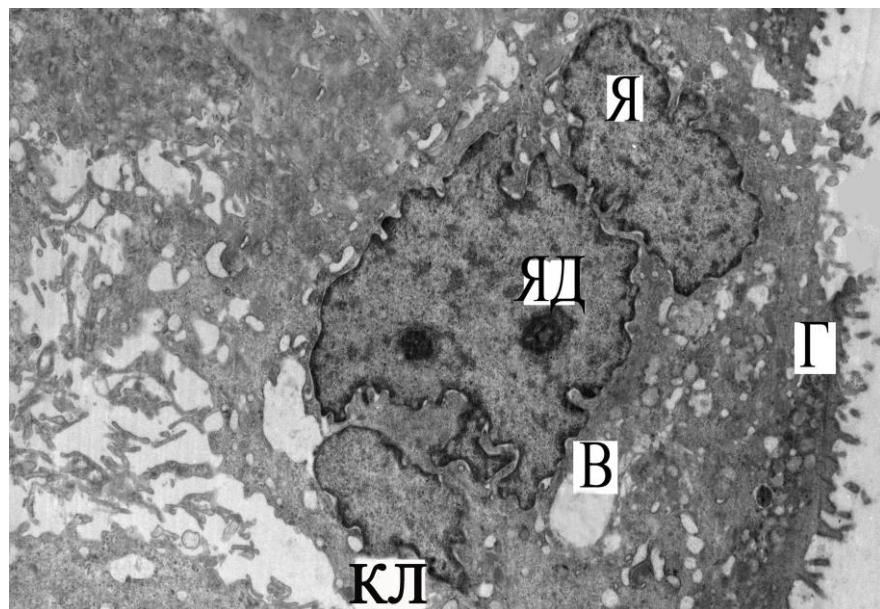
*Рисунок 27. Бронхиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Участок реснитчатого эпителиоцита. Расширение и увеличение в объеме цистерн эндоплазматического ретикулума (ЭР), гетерогенные популяции митохондрий (М, М2). Ц – цитоплазма. Ув. 15000*

Пластинчатый комплекс Гольджи в эпителиальных клетках определялся в околоядерной зоне, от него «отшнуровывались» многочисленные полиморфные электронно-плотные гранулы. Митохондрии равномерно распределялись в цитоплазме, в них визуализировался либо электронно-прозрачный или электронно-плотный матрикс. В микропрепаратах у пациентов этой группы определялась вакуолизация цитоплазматического матрикса и эндоплазматической сети (рис. 28).



**Рисунок 28.** Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Участок реснитчатого эпителиоцита. Вакуоли эндоплазматической сети (ЭС). Деструкция митохондрий с преобладанием электронноплотного матрикса (МХ). Скопление полисом (ПС). Неравномерное просветление цитоплазматического матрикса (ЦПМ). Ув. 25000

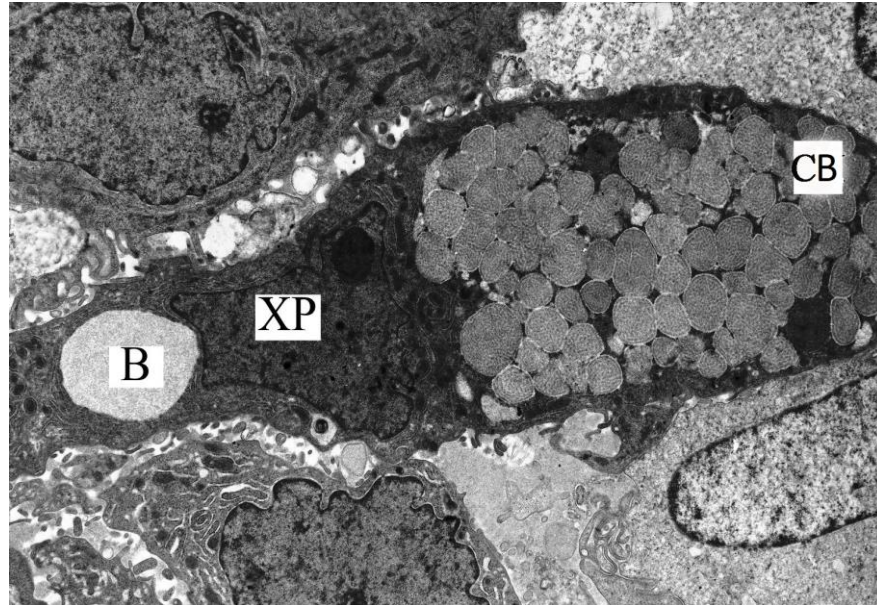
В клетках мерцательного эпителия у этой группы пациентов определялись ядра неправильной формы с множественными инвагинациями и конденсированной структурой хроматина (рис. 29).



**Рисунок 29.** Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Деструкция и полное разрушение реснитчатого аппарата. Множественные инвагинации кариолеммы (КЛ), хроматин в ядре (Я), полиморфизм ядрышек (ЯД), скопление гранул (Г) в апикальной части клетки, множественные, гетерогенные вакуоли в цитоплазме (В). Ув. 8500

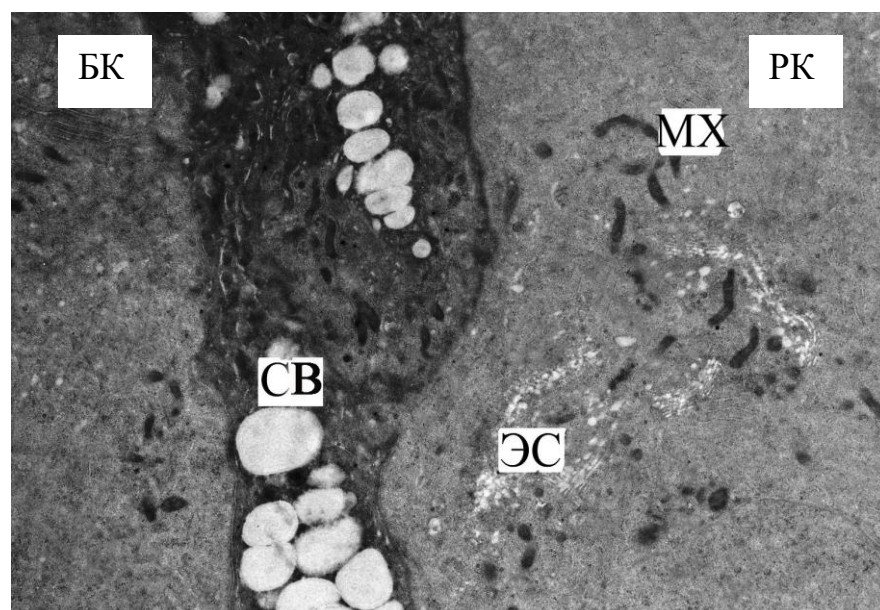


В бокаловидных экзокриноцитах бронхиальной стенки определялись клетки с гетерогенными секреторными вакуолями и содержимым варьирующей электронной плотности, а также крупные эпителиоциты с плотно упакованными гранулами слизистого секрета (рис. 30).



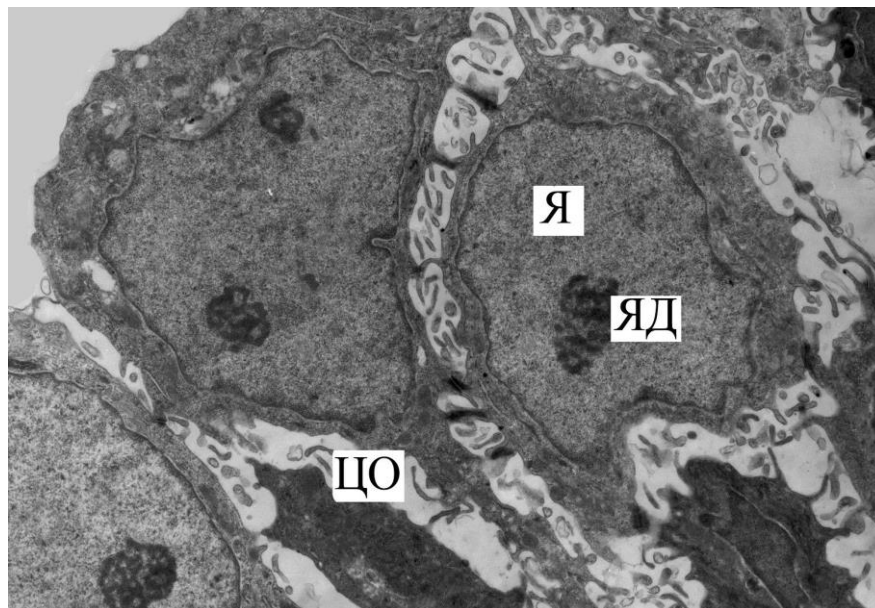
*Рисунок 30. Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Выраженная конденсация хроматина (XP) в ядре. Образование крупной вакуоли в перинуклеарном пространстве (B). Изменение слизистого компонента в секреторных везикулах (CB) бокаловидных экзокриноцитов. Ув. 8500*

В апикальной части бокаловидных экзокриноцитов определялись мелкие электронно-плотные осмиофильные везикулы (рис. 31).



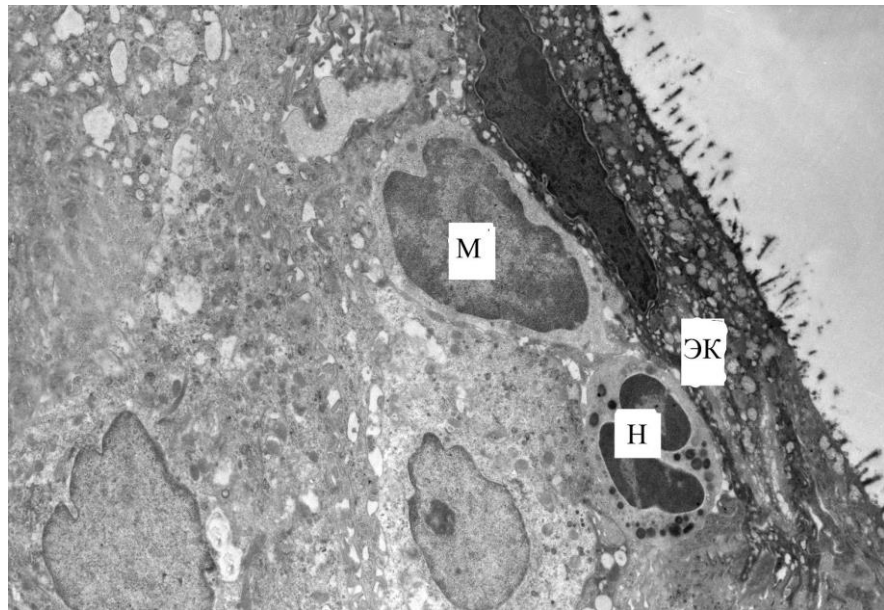
**Рисунок 31.** Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. МХ – митохондрии, ЭС – эндоплазматическая сеть в реснитчатых клетках (РК). Выраженное уменьшение количества секреторных везикул (СВ) в бокаловидных клетках. Ув. 10000

Базальные эпителиоциты были полигональной формы с осмиофильным ядром, цитоплазмой и многочисленными цитоплазматическими отростками (рис. 32).



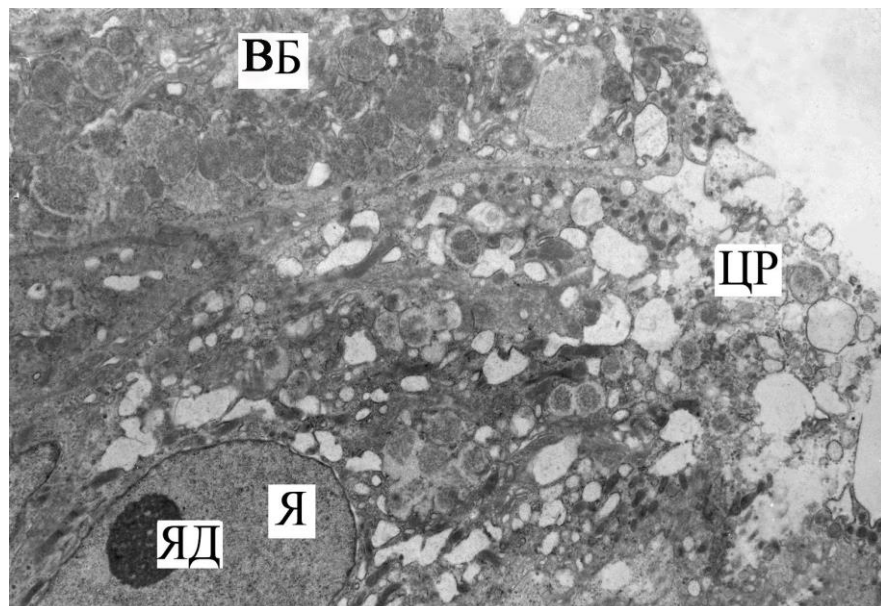
**Рисунок 32.** Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Я – ядро. ЯД – ядрышко. Многочисленные цитоплазматические отростки (ЦО) в базальных эпителиоцитах. Ув. 14000

При электронно-микроскопическом исследовании бронхиобиоптатов пациентов с ХОБЛ нами выявлялось снижение или нередко полное исчезновение многорядности эпителиального пласта с превращением оставшихся клеток в эндотелиоподобные, с отсутствием признаков реснитчатых эпителиоцитов (рис. 33).



**Рисунок 33.** Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. ЭК – эпителиальные клетки. М – макрофаг. Н – нейтрофильный гранулоцит. Снижение высоты эпителиального пласта, утрата его многорядности, уплощение эпителиоцитов с выраженной деформацией реснитчатого аппарата и образованием многочисленных микроворсинок. Ув. 8000

Важно отметить, что у пациентов с данной патологией присутствуют значительные ультраструктурные повреждения эпителиального пласта с изменением его специфичности (рис. 34).

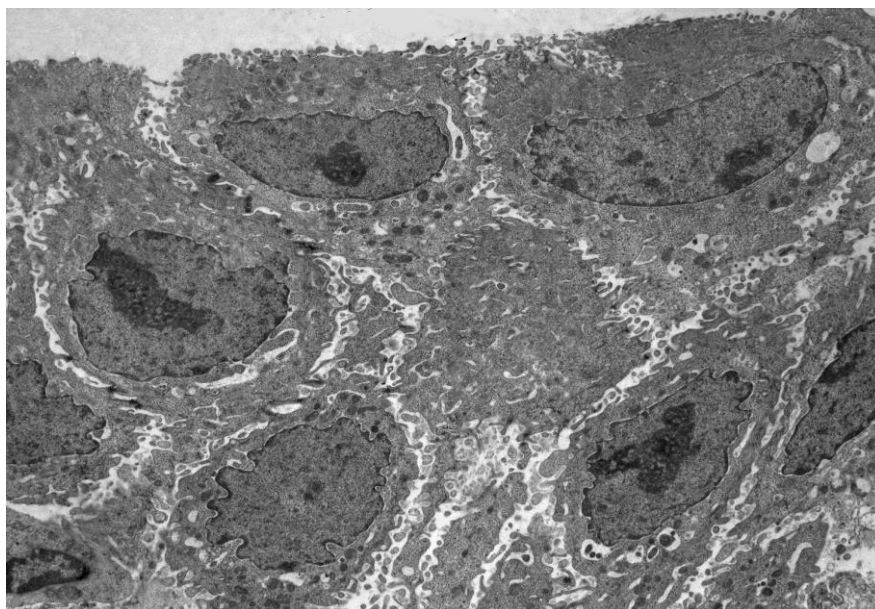


**Рисунок 34.** Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. ВБ – вакуоли бокаловидных экзокриноцитов. Я – ядро. ЯД – ядрышко. Электронно-



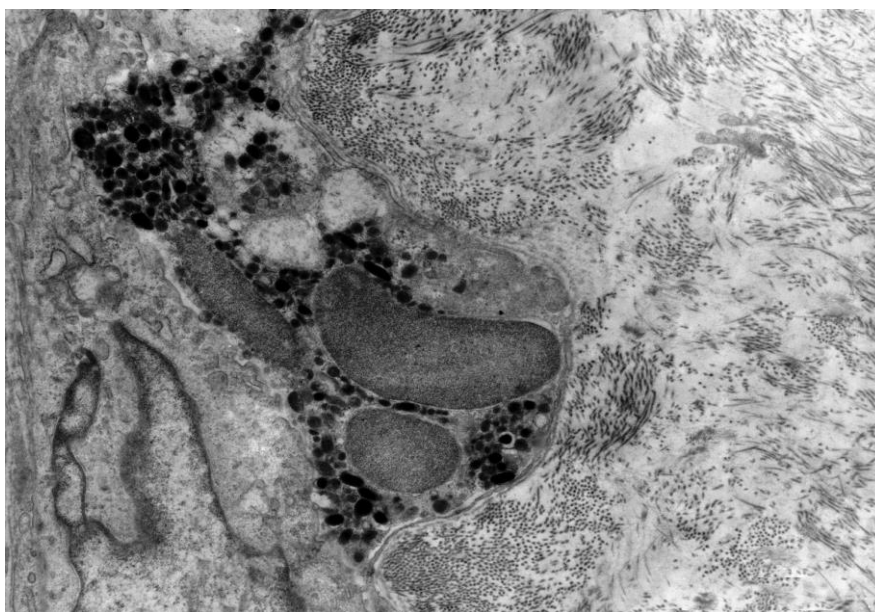
*микроскопическая дезорганизация и сниженная осмиофилия цитоплазматического матрикса реснитчатого эпителиоцита (ЦР). Ув. 8000*

В клетках реснитчатого эпителия выявлялись признаки регенераторно-пластической недостаточности, оставшиеся мембранные органеллы подвергались дегенерации (рис. 35).



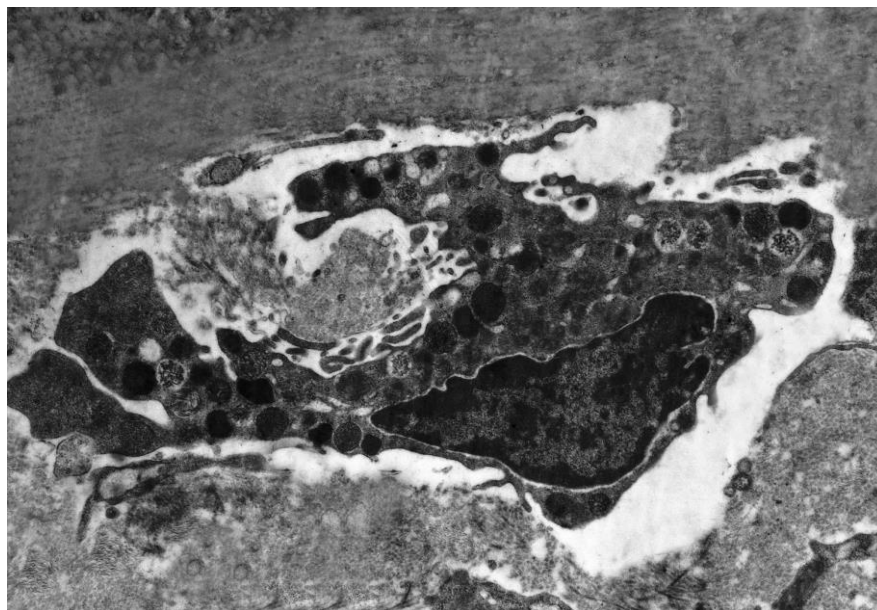
**Рисунок 35.** *Бронхиоптит курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Выраженное повреждение и отсутствие признаков дифференцировки бронхиальных эпителиоцитов. Ув. 6500*

Среди нейтрофилов, инфильтрирующих СОБ, доминировали гранулоциты с вакуолями и крупными фаголизосомами в цитоплазме (рис. 36).



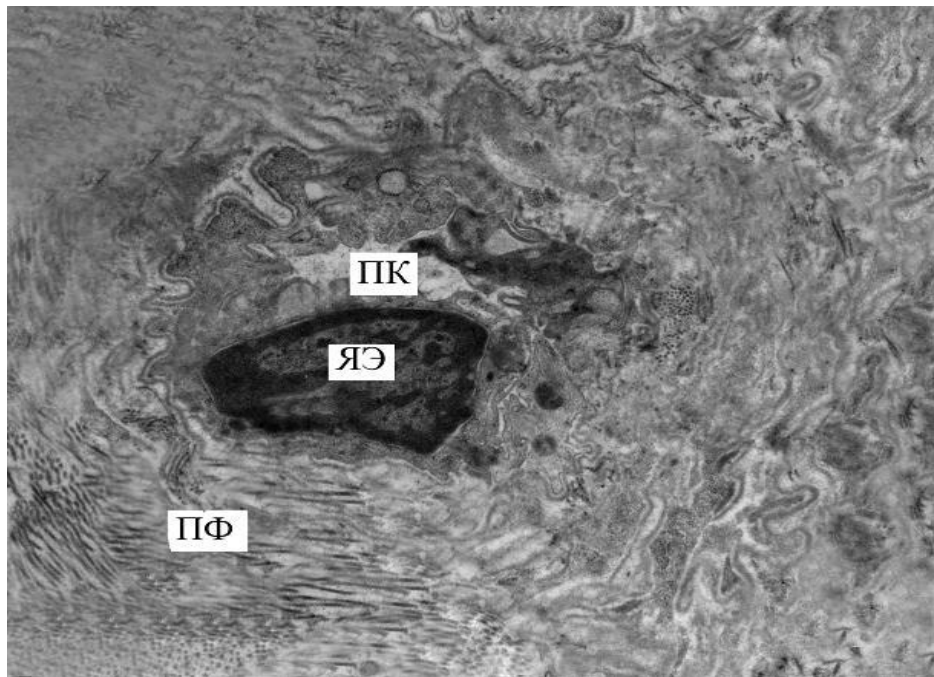
*Рисунок 36. Бронхиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Лизосомы, вакуоли и фаголизосомы в цитоплазме нейтрофильного гранулоцита. Ув. 11500*

В СОБ определялись несколько популяций макрофагов – клетки с разрушением цитоплазматической мембраны, признаками дегенерации и сниженным числом фагосом. В других макрофагах (зрелого фагоцитирующего фенотипа) определялись расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети, большое количество фаголизосом, многочисленные рибосомы и полисомы, а также множество мономорфных митохондрии (рис. 37).



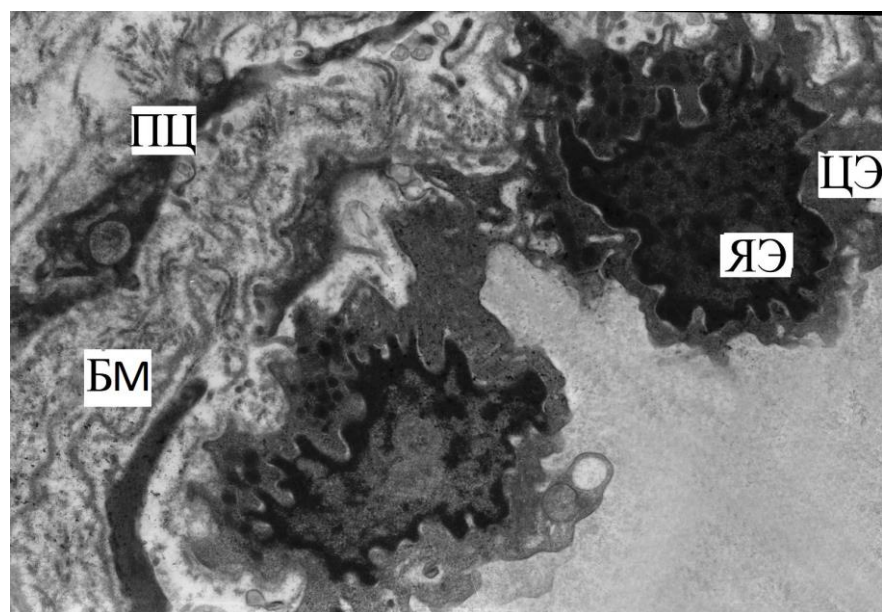
*Рисунок 37. Бронхиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Фагоцитирующий макрофаг в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов. Ув. 11500*

У пациентов этой группы выявлялось резкое уменьшение просвета капилляров за счет выраженного фиброза и отека (рис. 38).



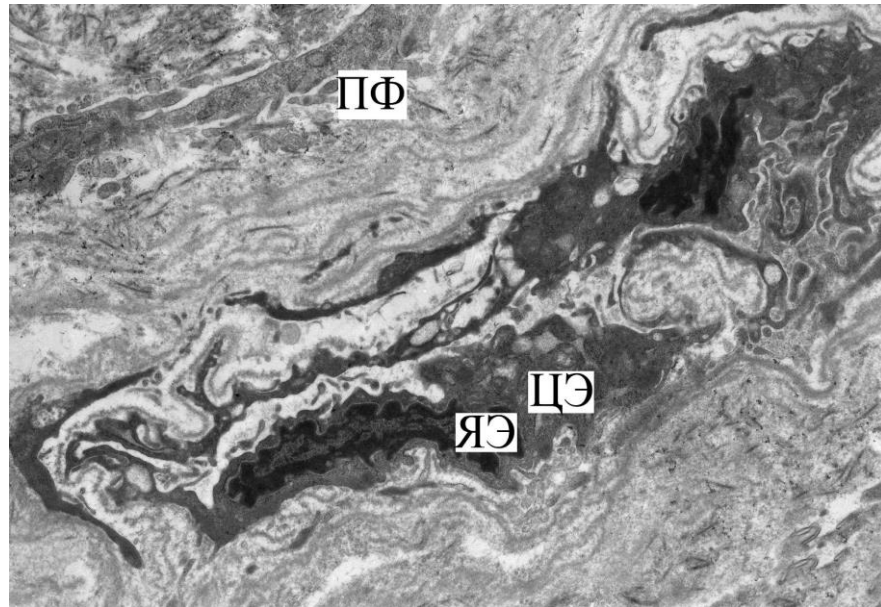
**Рисунок 38.** Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. ЯЭ – ядро эндотелиоцита. Выраженное уменьшение просвета капилляра (ПК) за счет периваскулярного фиброза (ПФ). Ув. 10000

При периваскулярном разрастании соединительной ткани нарушалась транскапиллярная диффузия, что сопровождалось изменением формы эндотелиальных клеток (появление пикноморфных эндотелиоцитов). В них невозможно было детализировать органоиды, ядра нередко с множественными инвагинациями кариолеммы, с ультраструктурными признаками кариопикноза и кариорексиса (рис. 39).



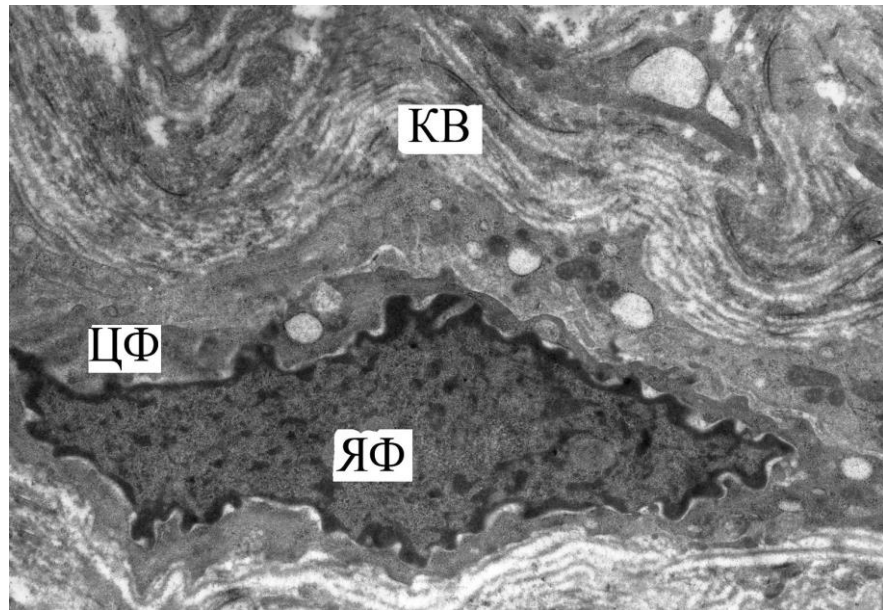
**Рисунок 39.** *Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Участок капилляра бронхиальной стенки. Дегенеративные процессы в ядре эндотелиоцита (ЯЭ), цитоплазме (ЦЭ) эндотелиальной клетки и перицита (ПЦ). БМ – базальная мембрана. Ув. 19500*

У части пациентов в сосудах собственной пластинке слизистой оболочки бронхов выявлялась гибель эндотелиоцитов с разрывом эндотелиальной выстилки (рис. 40).



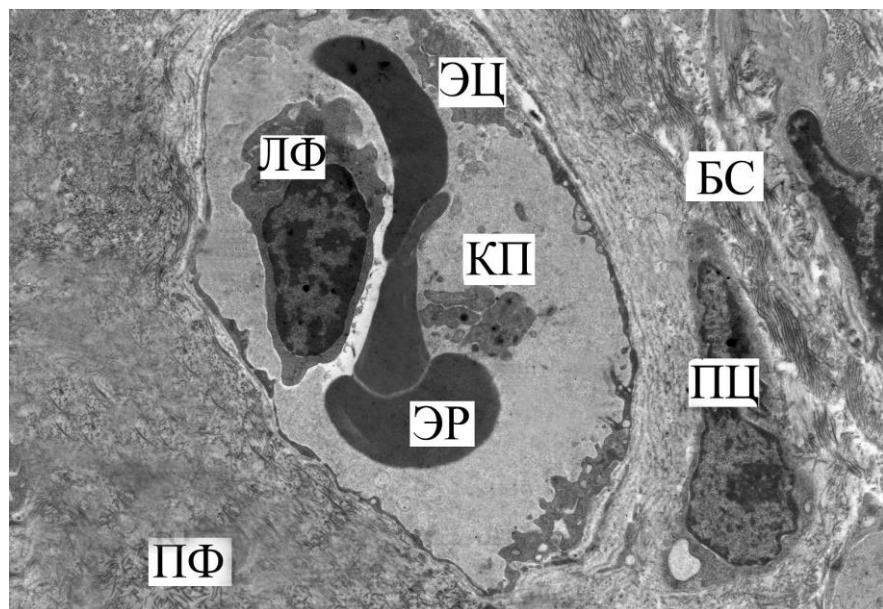
**Рисунок 40.** *Бронхиобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Участок сосуда собственной пластинки слизистой оболочки бронхов. ЯЭ – ядро эндотелиоцита. ЦЭ – цитоплазма эндотелиоцита. Истончение, множественные разрывы внутренней оболочки сосуда. ПФ – фиброз с преимущественно периваскулярной локализацией. Ув. 17000*

У таких пациентов в периваскулярной зоне можно обнаружить фибробласты с активной секрецией коллагеновых волокон (рис. 41).



*Рисунок 41. Бронхобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Фибробласт в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов. ЯФ – ядро фибробласта. ЦФ – цитоплазма фибробласта. КВ – коллагеновые волокна. Ув. 19500*

В сосудах микроциркуляторного русла собственной пластинки СОБ у этой группы пациентов определялись как кровяные клетки обычного строения, так и эритроциты в виде гантели, булавы или других причудливых форм (пойкилоцитоз), что может быть косвенным отражением хронической гипоксии, наблюдаемой у исследуемых групп пациентов (рис. 42).



*Рисунок 42. Бронхобиоптат курильщика с хронической обструктивной болезнью легких. Участок капилляра собственной пластинки слизистой оболочки бронхов. Истончение люминального слоя эндотелиоцита (ЭЦ) и утолщение базального слоя (БС). Перивакулярный*



*фиброз (ПФ). Лимфоцит (ЛФ). Морфологические признаки деформации эритроцитов (ЭР) и кровяных пластинок (КП). Ув. 14000*

**Резюме.** У курильщиков без клинических признаков хронической обструктивной болезни легких (группа сравнения) в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов выявлялись незначительные воспалительные и гемодинамические изменения, которые на ультраструктурном уровне реализовывались усилением секреторных и обменных процессов, приводящих к одновременной гиперплазии и гиперфункции белок-синтетического и энергетического аппарата эпителиальных клеток слизистой оболочки бронхов. Стимуляция энергетических и пластических процессов в эпителиальных клетках бронхиальной стенки интенсифицировала обменные и транспортные реакции в эндотелиоцитах микроциркуляторного русла, что отражалось в виде увеличенного микропиноцитозных везикул и цитоплазматических отростков. Важно отметить, что морфологические изменения слизистой оболочки бронхов у пациентов группы сравнения реализуются, преимущественно, на ультраструктурном уровне и связаны с адаптивной реакцией на воздействие триггера (табачного дыма).

*У курильщиков с хронической обструктивной болезнью легких*, в отличие от группы сравнения, нами выявлены дисрегенераторные процессы в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов с одновременными участками атрофии и плоскоклеточной метаплазии эпителиального пласта. Достаточно часто в бронхиальной стенке при хронической обструктивной болезни легких по сравнению со «здоровыми» курильщиками определялись участки гипоплазии бокаловидных экзокриноцитов с вакуолизацией эндоплазматического ретикулума и митохондрий в них. При ультраструктурном исследовании нами были выявлены признаки митохондриальной дисфункции - появление гетерогенных субпопуляций митохондрий с уплотнением и просветлением митохондриального матрикса, набуханием и вакуолизацией крист; признаки стресса эндоплазматического ретикулума - расширение и вакуолизация гранулярной эндоплазматической сети с формированием круглых электронно-плотных конгломератов.

Разрастание соединительной ткани в бронхиальной стенке, наблюдаемое у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, приводило к изменению ее кровоснабжения с ультраструктурной трансформацией эндотелиальной выстилки и самих сосудов микроциркуляторного русла.

Регенераторно-пластическая недостаточность, а также морфологические признаки эндотелиальной дисфункции, выявленные нами у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, выражалась в виде большого количества эндотелиальных клеток с единичными микропиноцитозными везикулами и гранулами Вейбеля – Паладе.

### **3.4.2 Морфометрическая характеристика слизистой оболочки бронхов у «здоровых» курильщиков и больных ХОБЛ.**

При проведении морфометрического исследования бронхобиоптатов слизистой оболочки бронхов у пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой курильщиков без исследуемой патологии нами обнаружено достоверное увеличение ряда показателей (табл. 9).

В биоптатах слизистой оболочки бронхов при ХОБЛ, в отличие от курильщиков без ХОБЛ, зарегистрированы более высокие значения высоты эпителиального пласта и объемной плотности покровного эпителия, преимущественно, за счет базальных эпителиоцитов, что отражает нарушение регенераторных возможностей бронхиального эпителия (табл. 9).

Важно отметить, что у исследуемых пациентов основной группы в слизистой оболочке бронхов выявлено статистически значимое ( $p=0,006$ ) увеличение базальной пластинки, за счет фиброза бронхиальной стенки (2,73 (1,36-3,25) мкм в группе ХОБЛ; 1,49 (0-2,61) мкм в группе сравнения).

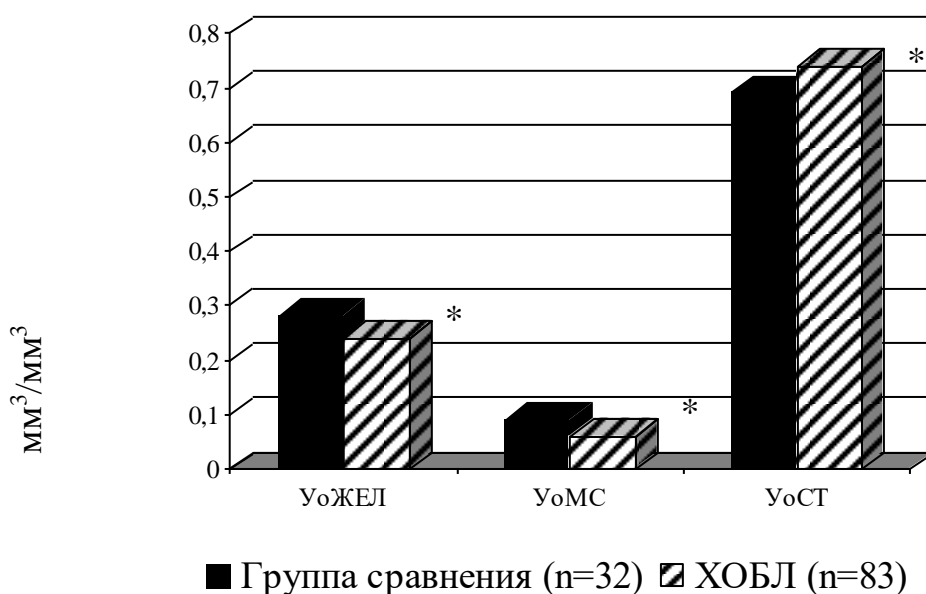
Этот факт подтверждается статистически значимым ( $p=0,005$ ) повышением объемной плотности соединительной ткани в бронхобиоптатах у пациентов с ХОБЛ с однонаправленным снижением относительного объема капилляров по сравнению со значениями в группе «здоровых» курильщиков, что связано с нарушением структурной архитектоники сосудов микроциркуляторного русла при исследуемой патологии (рис. 43).

Таблица 9

**Морфометрические характеристики бронхобиоптатов  
у исследуемых групп пациентов, Ме (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)**

| Исследуемые параметры   | Группа сравнения,<br>n=32 | ХОБЛ,<br>n=83       | p            |
|---|---------------------------|---------------------|--------------|
| Удельный объем покровного эпителия, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> (VV <sub>п.э.</sub> )          | 0,21 (0,15-0,26)          | 0,28 (0,20-0,36)    | <b>0,017</b> |
| Удельный объем реснитчатых эпителиоцитов, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> (VV <sub>рес.э.</sub> )  | 0,13 (0,09-0,15)          | 0,17 (0,12-0,18)    | 0,06         |
| Удельный объем бокаловидных эпителиоцитов, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> (VV <sub>бок.э.</sub> ) | 0,04 (0,03-0,04)          | 0,04 (0,02-0,05)    | 0,58         |
| Удельный объем базальных эпителиоцитов (VV <sub>баз.э.</sub> ), мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup>    | 0,04 (0,02-0,05)          | 0,06 (0,04-0,08)    | <b>0,008</b> |
| Нэ высота эпителия, (мкм)   | 52,72 (38,87-62,64)       | 77,09 (64,25-88,50) | <b>0,001</b> |
| Нб толщина базальной мембраны, (мкм)  | 1,49 (0-2,61)             | 2,73 (1,36-3,25)    | <b>0,006</b> |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий;*



**Рисунок 43.** Показатели удельного объема тканевых структур подслизистой оболочки бронхов у исследуемых групп пациентов: n – количество пациентов; УОжел, УОмс,



*УОст* – удельный объем желез, микрососудов, соединительной ткани; \* – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) при сравнении показателей у исследуемых групп пациентов.

При изучении биоптатов слизистой оболочки бронхов у курящих пациентов с исследуемой нозологией и у «здоровых» курильщиков был сделан акцент на выявление метаплазии, поскольку она с одной стороны является компенсаторной реакцией организма, направленной на защиту эпителиального пласта от воспалительных агентов, а с другой стороны может быть расценена как предопухолевая трансформация бронхиального эпителия. Данные статистического анализа биоптатов слизистой оболочки бронхов указывают на то, что частота встречаемости метаплазии в группе курильщиков с ХОБЛ достоверно выше, чем в группе сравнения ( $p = 0,0075$ ). Критерий Фишера составляет в основной группе  $F = 1,551$ , а в группе сравнения  $F = 0,673$ . При морфометрическом анализе биоптатов СОБ у курильщиков с ХОБЛ в 12,2 % случаев обнаруживались участки атрофии эпителия и желез, чередовавшиеся с очагами плоскоклеточной метаплазии.

При проведении дискриминантного анализа и построении уравнения линейной дискриминантной функции (ЛДФ) нами установлено, что наибольший вклад в различия между пациентами с хронической обструктивной болезнью легких и группы сравнения принадлежит следующим морфологическим критериям: объемной плотности покровного эпителия, базальных эпителиоцитов, высоте эпителиального пласта и толщине базальной мембраны (табл. 10).

**Таблица 10**

**Данные дискриминантного анализа морфометрических тестов у курящих лиц без исследуемой нозологии и с хронической обструктивной болезнью легких**

| Показатели   | Группа сравнения, n=32                   | ХОБЛ, n=83 |
|--|--|------------|
| Правильность классификации, %  | 100                                      | 88,6       |
| Включенные в уравнение ЛДФ морфологические тесты, $\lambda$ Уилкса и статистическая значимость | $VV_{п.э.}, \lambda = 0,53; p < 0,001$   |            |
|  | $VV_{баз.э.}, \lambda = 0,45; p < 0,001$ |            |
|  | $Hэ; \lambda = 0,36; p < 0,001$          |            |

|                              |                                    |
|------------------------------|------------------------------------|
|                              | $H_b; \lambda=0,57; p<0,001$       |
| Характеристика уравнения ЛДФ | $\lambda=0,26; F= 36,72; p<0,0001$ |

*Примечание: n – количество пациентов; ЛДФ – линейная дискриминантная функция;  $VV_{п.э.}$  – удельный объем покровного эпителия;  $VV_{баз.э.}$  – удельный объем базальных эпителиоцитов;  $H_э$  – высота эпителия;  $H_b$  – толщина базальной мембраны*

**Резюме.** Формирование ХОБЛ у курильщиков согласно полученным морфометрическим данным сопровождалось увеличением высоты эпителиального пласта и объемной плотности покровного эпителия, преимущественно, за счет базальных эпителиоцитов. В данной группе наблюдалось более выраженное утолщение базальной мембраны, за счет фиброза собственной пластинки слизистой оболочки, что подтверждалось статистически значимым увеличением объемной плотности соединительной ткани с одновременным снижением относительного объема капилляров в собственной пластинке СОБ по сравнению со значениями в группе курильщиков без ХОБЛ.

У курильщиков с ХОБЛ в СОБ была обнаружена плоскоклеточная метаплазия, частота встречаемости которой была выше, чем у лиц группы сравнения.

В ходе дискриминантного анализа было показано, что доминантное значение в ремоделировании бронхиальной стенки при формировании ХОБЛ принадлежит объемной плотности покровного эпителия, базальных эпителиоцитов, высоте эпителиального пласта и толщине базальной мембраны.

### **3.4.3 Морфологическая и функциональная характеристика клеточного состава воспалительного инфильтрата бронхов у «здоровых» курильщиков и при ХОБЛ**

Нами установлено, что при длительном воздействии табачного дыма, ассоциированном с развитием ХОБЛ общая плотность инфильтрата в  $1\text{мм}^2$  бронхобиоптата статистически значимо ( $p=0,001$ ) превышала параметры группы сравнения. Это связано как с клеточными элементами рыхлой волокнистой соединительной ткани, так и с клетками, мигрирующими в подслизистую оболочку бронхов из периферической крови (табл. 11).

Возрастание плотности клеточного инфильтрата у курящих пациентов с ХОБЛ реализовывалось за счет НФ, МФ, плазматических клеток с однонаправленным повышением числа их внутриэпителиальных форм (табл 11, 12).

Таблица 11

**Морфометрические показатели состава клеточного инфильтрата и клеток стромы собственной пластинки СОБ в группе сравнения и у курильщиков с ХОБЛ, Ме ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )**

| Исследуемые параметры (на 1 мм <sup>2</sup> среза) | Группа сравнения, n=32 | ХОБЛ, n=83            | p            |
|--|------------------------|-----------------------|--------------|
| Суммарная плотность инфильтрата                    | 150,41 (47,05-249,60)  | 276,6 (215,37-323,21) | <b>0,001</b> |
| Макрофаги  | 50,59 (9,26-87,54)     | 88,35 (68,50-108,50)  | <b>0,003</b> |
| Лимфоциты  | 32,89 (12,45-58,80)    | 37,11 (19,40-49,40)   | 0,05         |
| Плазмоциты   | 6,03 (0-8,25)          | 8,01 (3,25-10,25)     | 0,041        |
| Нейтрофилы   | 59,85 (12,36-104,60)   | 141,01 (108,3-170,80) | <b>0,001</b> |
| Эозинофилы   | 1,06 (0-2,43)          | 1,58 (0,82-2,25)      | 0,17         |
| Фибробласты  | 177,82 (112,56-226,87) | 281,02(163,52-404,16) | <b>0,004</b> |

*Примечание: n – количество пациентов; p–статистическая значимость различий;*

Таблица 12

**Морфофункциональная характеристика межэпителиального клеточного инфильтрата СОБ у группы сравнения и пациентов с ХОБЛ (на 1 мм<sup>2</sup> среза), Ме ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )**

| Показатель (на 1 мм <sup>2</sup> )          | Группа сравнения, n=32 | ХОБЛ, n=83        | Уровень значимости различий |
|---|------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Плотность межэпителиальных нейтрофилов (МН) | 2,95 (0,00-8,42)       | 8,17 (4,34-10,41) | <b>0,001</b>                |
| Плотность межэпителиальных                  | 0,09 (0- 0)            | 0,43 (0-0)        | 0,83                        |

|  |                 |                  |              |
|--|-----------------|------------------|--------------|
| эозинофилов (МЭ)                           |                 |                  |              |
| Плотность межэпителиальных лимфоцитов (МЛ) | 2,15 (0 - 5,00) | 4,81 (2,28-6,25) | <b>0,004</b> |

Для оценки функциональной активности эозинофилов (ЭФ) и тучных клеток (ТК) нами подсчитывались низко-, умеренно- и высокогранулированные клетки, что соответствовало высокой (I), умеренной (II) и низкой (III) степени дегрануляции. Нами также оценивался средний цитохимический коэффициент (СЦК), характеризующий усредненную степень гранулированности, а значит и функциональную активность.

При морфометрическом анализе плотности распределения и функциональной активности ТК в бронхах у курильщиков, ассоциированных с развитием ХОБЛ по сравнению со «здоровыми» курильщиками, нами выявлено статистически значимое ( $p=0,002$ ) повышение плотности распределения этих клеточных популяций в 1 мм<sup>2</sup> среза, с одновременно более высоким числом низко- и умеренно- гранулированных форм (табл. 13).

Таблица 13

**Морфологический анализ тучных клеток и степень их дегрануляции у группы сравнения и пациентов с ХОБЛ, Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)**

| Исследуемые параметры (на 1 мм <sup>2</sup> среза)                       | Группа сравнения, n=32 | ХОБЛ, n=83          | P            |
|--|------------------------|---------------------|--------------|
| Плотность тучных клеток  | 40,25 (13,45-73,37)    | 72,88 (38,33-98,66) | <b>0,002</b> |
| Тучные клетки с высокой степенью дегрануляции (низкогранулированные)     | 2,07 (4,72-14,32)      | 8,08 (1,52-10,81)   | <b>0,035</b> |
| Тучные клетки со средней степенью дегрануляции (умеренногранулированные) | 12,29 (2,26-20,93)     | 20,80 (12,45-28,85) | <b>0,004</b> |
| Тучные клетки с низкой степенью дегрануляции (высокогранулированные)     | 29,32 (12,67-39,00)    | 40,02 (18,83-53,28) | 0,08         |

|                                |                  |                  |              |
|--------------------------------|------------------|------------------|--------------|
| СЦК дегрануляции тучных клеток | 6,30 (2,36-2,77) | 2,39 (2,32-2,50) | <b>0,012</b> |
|--------------------------------|------------------|------------------|--------------|

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий.*

Аналогичные результаты были получены при оценке среднего цитохимического коэффициента (СЦК). У пациентов с ХОБЛ отмечается статистически значимое ( $p=0,012$ ) уменьшение исследуемого морфологического показателя за счет преобладания ТК I (низко-), II (умеренно-) гранулированного типа (табл. 13).

Полученные нами результаты по оценке функциональной активности данных клеточных популяций подтверждают более высокую функциональную активность ТК в группе пациентов с ХОБЛ и участие их в персистировании воспалительного процесса в бронхиальной стенке [131, 230, 231].

Для оценки выраженности фиброза бронхиальной стенки в 1 мм<sup>2</sup> слизистой оболочки бронхов у исследуемых групп пациентов нами подсчитывалась плотность фибробластов. Количество последних у исследуемой группы пациентов статистически значимо ( $p=0,001$ ) превышало контрольные значения – при ХОБЛ 281,02 (163,52-404,16) и соответственно в группе сравнения 177,82 (112,56-226,87);

Ведущая роль в развитии и поддержании патологического процесса в бронхиальной стенке у курящих пациентов с ХОБЛ связана с плотностью клеточного инфильтрата, МФ, НФ (табл. 14), а также межэпителиальных ЛФ и НФ (табл. 15).

**Таблица 14**

**Данные дискриминантного анализа клеточных показателей инфильтрата в слизистой оболочке бронхов в исследуемых группах пациентов**

| Показатели   | Группа сравнения,<br>n=32                                      | ХОБЛ,<br>n=83 |
|--|--|---------------|
| Правильность классификации, %                                      | 86,5   | 92,4          |
| Включенные в уравнение ЛДФ морфологические тесты, $\lambda$ Уилкса | Суммарная плотность инфильтрата;<br>$\lambda=0,69$ ; $p<0,001$ |               |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| и статистическая значимость  | Плотность МФ на 1 мм <sup>2</sup> собственной пластинки слизистой оболочки бронхов<br>$\lambda=0,93$ ; $p<0,001$ |
|                              | Плотность НФ на 1 мм <sup>2</sup> собственной пластинки слизистой оболочки бронхов<br>$\lambda=0,64$ ; $p<0,001$ |
| Характеристика уравнения ЛДФ | $\lambda=0,61$ ; $F=45,9$ ; $p<0,0001$   |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий; ЛДФ – линейная дискриминантная функция;*

Таблица 15

**Данные дискриминантного анализа клеточных показателей инфильтрата в слизистой оболочке бронхов в исследуемых группах пациентов**

| Показатели  | Группа сравнения,   | ХОБЛ, |
|---|---|-------|
|   | n=32  | n=83  |
| Правильность классификации, %   | 94,6  | 87,5  |
| Включенные в уравнение ЛДФ морфологические тесты $\lambda$ Уилкса и статистическая значимость | Плотность межэпителиальных ЛФ на 1 мм <sup>2</sup> собственной пластинки слизистой оболочки бронхов; $\lambda=0,69$ ; $p<0,001$ |       |
|   | Плотность межэпителиальных НФ на 1 мм <sup>2</sup> собственной пластинки слизистой оболочки бронхов; $\lambda=0,64$ ; $p<0,001$ |       |
| Характеристика уравнения ЛДФ  | $\lambda=0,38$ ; $F=84,21$ ; $p<0,0001$   |       |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий; ЛДФ – линейная дискриминантная функция;*

**Резюме.** Согласно данным морфометрического исследования плотности клеточного инфильтрата в бронхиальной стенке пациенты с ХОБЛ отличались от группы сравнения более выраженными признаками воспаления. Этот факт подтверждался достоверно более высокими показателями плотности воспалительного инфильтрата в основной группе за счет нейтрофильных гранулоцитов, гистиоцитарно-макрофагальных клеточных форм и плотности их межэпителиальных форм. Кроме того, при исследовании была выявлена более

высокая плотность ТК в группе ХОБЛ, преимущественно за счет популяций с высокой и средней степенью дегрануляции (низко- и умеренногранулированные).

Повышенная плотность фибробластов в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов у лиц основной группы по сравнению с группой курильщиков без ХОБЛ отражала более выраженные процессы ремоделирования бронхиальной стенки.

Дискриминантный анализ продемонстрировал, что доминантные показатели в развитии воспалительного процесса в слизистой оболочке бронхиальной стенки представлены плотностью клеточного инфильтрата, плотностью нейтрофилов, макрофагов, а также межэпителиальных лимфоцитов и нейтрофилов.

#### **3.4.4 Ультраструктурная характеристика бронхиального эпителия и сосудов собственной пластинки слизистой оболочки бронхов у «здоровых» курильщиков и при хронической обструктивной болезнью легких**

С целью выявления молекулярных маркеров ремоделирования бронхиальной стенки нами был проведен анализ ультраструктурной организации эпителиального пласта.

Нами не обнаружено статистически значимых отличий при морфометрической оценке ультраструктур реснитчатых эпителиоцитов у пациентов с ХОБЛ и группы сравнения (табл. 16). В тоже время подсчет ядерно-цитоплазматического отношения в реснитчатых эпителиоцитах СОБ у пациентов с ХОБЛ показал статистически значимое ( $p=0,004$ ) снижение исследуемого показателя за счет увеличения удельного объема цитоплазмы при ХОБЛ. Это может быть свидетельством активации дренажной функции реснитчатого эпителия, наблюдаемого в группе сравнения за счет стимуляции пластического и энергетического обмена.

**Таблица 16**

#### **Морфометрические показатели ультраструктур в реснитчатых клетках эпителия бронхов у исследуемых групп пациентов, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )**

|   |                           |               |   |
|---|---------------------------|---------------|---|
| Удельный объем, (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> ) | Группа сравнения,<br>n=32 | ХОБЛ,<br>n=83 | p |
|---|---------------------------|---------------|---|

|   |                  |                  |             |
|---|------------------|------------------|-------------|
| Митохондрий, Vv мит.                          | 0,18 (0,15-0,24) | 0,18 (0,15-0,26) | 0,88        |
| Эндоплазматической сети, Vv эпс.              | 0,14 (0,11-0,18) | 0,15 (0,10-0,19) | 0,80        |
| Лизосом, Vv лиз.                              | 0,05 (0,04-0,08) | 0,06 (0,04-0,08) | 0,21        |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение, ЯЦО рсн. | 0,52 (0,38-0,64) | 0,45 (0,37-0,58) | <b>0,04</b> |

*Примечание: n – количество пациентов; p–статистическая значимость различий; ЛДФ – линейная дискриминантная функция;*

Морфометрический анализ ультраструктур в бокаловидных эпителиоцитах СОБ у пациентов с ХОБЛ выявил более высокие показатели удельного объема цистерн эндоплазматического ретикулума с одновременным снижением объемной плотности митохондрий по сравнению с группой без клинических признаков ХОБЛ (табл. 17).

Эти результаты свидетельствуют об усилении слизиобразующей функции бокаловидных эпителиоцитов у пациентов с ХОБЛ с одновременным нарушением экстрюзии бронхиального секрета. А также данные изменения могут быть признаками развития стресса и перегрузки ЭПС на фоне митохондриальной дисфункции у курящих лиц с ХОБЛ.

**Таблица 17**

**Морфометрические показатели ультраструктур в бокаловидных эпителиоцитах слизистой оболочки бронхов у группы «здоровых» курильщиков и курильщиков с ХОБЛ, Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)**

| Удельный объем, (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> ) | Группа сравнения,<br>n=32 | ХОБЛ,<br>n=83    | p            |
|---|---------------------------|------------------|--------------|
| Митохондрий, Vv мит.                                  | 0,12 (0,09-0,15)          | 0,10 (0,08-0,12) | <b>0,034</b> |
| Эндоплазматической сети, Vv эпс.                      | 0,10 (0,08-0,12)          | 0,12 (0,08-0,14) | <b>0,049</b> |
| Лизосом, Vv лиз.                                      | 0,04 (0,02-0,04)          | 0,04 (0,03-0,06) | 0,06         |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение, ЯЦО рсн.         | 0,36 (0,28-0,54)          | 0,32 (0,20-0,54) | 0,31         |

*Примечание: n – количество пациентов; p–статистическая значимость различий; ЛДФ – линейная дискриминантная функция;*



При морфометрическом исследовании ультраструктур в базальных эпителиоцитах у курильщиков с ХОБЛ установлено достоверное ( $p=0,024$ ) расширение цистерн как гранулярной, так и агранулярной эндоплазматической сети, с увеличением их удельного объема по сравнению с лицами группы «здоровых» курильщиков (табл. 18).

Этот факт может быть связан с активацией белкового, углеводного и липидного обменов, отражающих повышенную функциональную активность базальных эпителиоцитов, направленных на восстановление эпителиального пласта в условиях хронического воспалительного процесса, а также быть признаком развития стресса и перегрузки ЭПС.

Таблица 18

**Морфометрические показатели ультраструктур базальных эпителиоцитов слизистой оболочки бронхов у группы «здоровых» курильщиков и курильщиков с ХОБЛ, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )**

| Удельный объем, ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ) | Группа сравнения,<br>n=32 | ХОБЛ,<br>n=83    | p            |
|---|---------------------------|------------------|--------------|
| Митохондрий, $V_v$ мит.                         | 0,12 (0,10-0,14)          | 0,11 (0,10-0,14) | 0,14         |
| Эндоплазматической сети,<br>эпс.                | 0,08 (0,07-0,12)          | 0,10 (0,08-0,14) | <b>0,024</b> |
| Лизосом, $V_v$ лиз.                             | 0,04 (0,02-0,06)          | 0,04 (0,02-0,05) | 0,91         |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение, ЯЦО рсн.   | 0,58 (0,34-0,71)          | 0,58 (0,34-0,71) | 0,75         |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий;*

Дискриминантный анализ показал, что наибольший вклад в развитие заболевания ХОБЛ у курильщиков принадлежит удельному объему митохондрий и эндоплазматической сети в бокаловидных (табл. 19) и базальных эпителиоцитах (табл. 20).

Таблица 19

**Результаты дискриминантного анализа морфометрических тестов в слизистой оболочке бронхов группы сравнения и пациентов с ХОБЛ**

| Показатели | Группа сравнения, | ХОБЛ, |
|------------|-------------------|-------|
|------------|-------------------|-------|

|  | n=32  | n=83 |
|--|---|------|
| Правильность классификации, %  | 100   | 88,6 |
| Включенные в уравнение ЛДФ морфологические тесты, $\lambda$ Уилкса и статистическая значимость | УО МХ в бокаловидных эпителиоцитах, $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ; $\lambda=0,45$ ; $p<0,001$  |      |
|  | УО ЭПС в бокаловидных эпителиоцитах, $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ; $\lambda=0,36$ ; $p<0,001$ |      |
| Характеристика уравнения ЛДФ   | $\lambda=0,31$ ; $F=74,92$ ; $p<0,0001$   |      |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий; ЛДФ – линейная дискриминантная функция; УО МХ – удельный объем митохондрий; УО ЭПС – удельный объем эндоплазматической сети;*

Таблица 20

**Результаты дискриминантного анализа морфометрических тестов в слизистой оболочке бронхов группы сравнения и пациентов с ХОБЛ**

| Показатели  | Группа сравнения,  | ХОБЛ, |
|---|--|-------|
|   | n=32   | n=83  |
| Правильность классификации, %   | 96,5   | 98,2  |
| Включенные в уравнение ЛДФ морфологические тесты $\lambda$ Уилкса и статистическая значимость | УО МХ в базальных эпителиоцитах, $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ; $\lambda=0,21$ ; $p<0,001$  |       |
|   | УО ЭПС в базальных эпителиоцитах, $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ; $\lambda=0,42$ ; $p<0,001$ |       |
| Характеристика уравнения ЛДФ  | $\lambda=0,62$ ; $F=41,18$ ; $p<0,0001$  |       |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий; ЛДФ – линейная дискриминантная функция; УО МХ – удельный объем митохондрий; УО ЭПС – удельный объем эндоплазматической сети;*

Анализ сосудистого звена в бронхиальной стенке у курящих пациентов, ассоциированных с ХОБЛ, по сравнению с группой без клинических признаков заболевания обнаружил статистически значимое ( $p=0,004$ ) снижение удельного объема капилляров (0,44 (0,28-0,56  $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ) и 0,69 (0,36-0,88)  $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$  соответственно).

Морфометрическая оценка ультраструктур эндотелиальных клеток в капиллярах слизистой оболочки бронхов у пациентов с ХОБЛ по сравнению со «здоровыми» курильщиками показала снижение удельного объема

микропиноцитозных везикул в эндотелиоцитах капилляров бронхиальной стенки (табл. 21). Что может быть связано с нарушением функциональной активности эндотелиальных клеток капилляров СОБ у исследуемых пациентов с нарушением транскапиллярного обмена.

При морфометрической оценке секреторных гранул Вейбеля-Палади у пациентов с ХОБЛ установлено снижение размера секреторных гранул по сравнению с группой без клинических признаков ХОБЛ (табл. 21). Что может отражаться в нарушении свертывающей системы крови у курильщиков основной группы, и подтверждается обнаружением большого количества капилляров с морфологическими признаками реологических изменений в виде стаза, сладжа и тромбоза (рис. 24, 42).

Таблица 21

**Ультраструктурные характеристики эндотелиоцитов капилляров  
бронхиальной стенки в исследуемых группах пациентов, Ме (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)**

| Исследуемые параметры   | Группа сравнения, n=32 | ХОБЛ, n=83          | p            |
|---|------------------------|---------------------|--------------|
| Удельный объем микропиноцитозных везикул, Vv пиноц (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> ). | 0,26 (0,18-0,34)       | 0,18 (0,15-0,28)    | <b>0,005</b> |
| Размер секреторных гранул Вейбеля-Палади, нм  | 432,2 (355,6-492,5)    | 429,6 (356,2-500,2) | <b>0,004</b> |
| Удельный объем секреторных гранул Вейбеля-Палади, Vv, %                                   | 15,04 (9,26-23,0)      | 16,42 (12,5-24,35)  | 0,10         |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий;*

На основании построенного уравнения линейной дискриминантной функции установлено, что из сосудистых параметров эндотелия, удельный объем микропиноцитозных везикул формировал значимые фенотипические различия между ХОБЛ и группой «здоровых» курильщиков (табл. 22).

Таблица 22

**Данные дискриминантного анализа морфологических величин сосудов  
слизистой оболочки бронхов в группе «здоровых» курильщиков и  
курильщиков с ХОБЛ**

| Показатели   | Группа сравнения,<br>n=32  | ХОБЛ,<br>n=83 |
|--|--|---------------|
| Правильность классификации, %  | 96,5   | 98,2          |
| Включенные в уравнение ЛДФ морфологические тесты, $\lambda$ Уилкса и статистическая значимость | Удельный объем микропиноцитозных везикул, $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ; $\lambda=0,45$ ; $p<0,001$ |               |
| Характеристика уравнения ЛДФ   | $\lambda=0,39$ ; $F=72,99$ ; $p<0,0001$  |               |

*Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий; ЛДФ – линейная дискриминантная функция;*

**Резюме.** Морфометрический анализ ультраструктур в клетках эпителиального пласта у пациентов с ХОБЛ, по сравнению с группой без ХОБЛ продемонстрировал увеличение удельного объема эндоплазматического ретикулума в бокаловидных и базальных клетках, с одновременным уменьшением удельного объема митохондрий в них.

У пациентов с ХОБЛ нами обнаружено снижение ядерно-цитоплазматического отношения в реснитчатых эпителиоцитах СОБ по сравнению с группой «здоровых» курильщиков.

Для курильщиков, ассоциированных с развитием ХОБЛ было характерно снижение удельного объема капилляров, при этом ультраструктурный анализ эндотелиальных клеток в капиллярах слизистой оболочки бронхов показал более низкие значения удельного объема МПВ и величины гранул Вейбеля-Палади по сравнению с группой «здоровых» курильщиков.

Дискриминантный анализ установил, что удельный объем микропиноцитозных везикул, митохондрий и эндоплазматической сети в бокаловидных и базальных эпителиоцитах являются ведущими показателями при remodelировании бронхиальной стенки, наблюдаемой у пациентов с ХОБЛ при воздействии табачного дыма.

### 3.4.5 Иммунологические маркеры в бронхиальном содержимом у «здоровых» курильщиков и у курильщиков с ХОБЛ

Согласно данным бронхоскопического исследования, которые рассмотрены нами в предыдущих разделах работы мы выявили структурные и молекулярные маркеры, отличающие характер изменений бронхиальной стенки в группе «здоровых» курильщиков и курильщиков с ХОБЛ.

При анализе молекулярных маркеров воспаления в бронхиальном содержимом у курящих лиц с хронической обструктивной болезнью легких по сравнению с группой курильщиков без исследуемого заболевания установлено статистически значимое ( $p =$  от 0,001) повышение концентрации интерферона- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ), фактора некроза опухоли альфа, а также интерлейкина-8, 10, TGF- $\beta_1$  (табл. 23). При анализе соотношения ИЛ4/ИНФ- $\gamma$  нами обнаружено статистически значимое снижение данного коэффициента у пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой «здоровых» курильщиков. Изменение этого коэффициента связано с увеличением концентрации основных иммунорегуляторных молекул таких как интерлейкин-10 и ИНФ- $\gamma$ , направленных на подавление хронических воспалительных реакций в бронхиальной стенке.

Согласно данным дискриминантного анализа значимая роль в развитии воспаления в слизистой оболочке бронхов у пациентов с ХОБЛ принадлежит концентрации фактора некроза опухоли-альфа и интерлейкина-8 в бронхиальном содержимом (табл. 24).

**Таблица 23**

#### Иммунологические маркеры в бронхиальном содержимом у пациентов группы сравнения и с хронической обструктивной болезнью легких, Ме ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )

| Исследуемые параметры (пг/мл) | Группа сравнения, n=32 | ХОБЛ, n=83              | p            |
|-------------------------------|------------------------|-------------------------|--------------|
| ИЛ-4                          | 52,27<br>(44,5-62,9)   | 68,25<br>(48,28-112,50) | 0,28         |
| ИНФ- $\gamma$                 | 45,25                  | 272,41                  | <b>0,002</b> |

|                   |                        |                           |              |
|-------------------|------------------------|---------------------------|--------------|
|                   | (40,25-78,43)          | (178,32-323,29)           |              |
| ИЛ4/ИНФ- $\gamma$ | 1,05 (0,74-1,30)       | 0,28 (0,16-0,39)          | <b>0,003</b> |
| TNF- $\alpha$     | 48,27<br>(25,37-67,25) | 246,84<br>(184,25-343,25) | <b>0,001</b> |
| ИЛ-8              | 5,53<br>(2,75-19,53)   | 713,70<br>(458,30-838,60) | <b>0,001</b> |
| ИЛ-10             | 5,76<br>(4,26-16,81)   | 60,36<br>(27,48-108,26)   | <b>0,002</b> |
| TGF- $\beta_1$    | 9,37<br>(3,91-13,94)   | 72,43<br>(59,26-89,47)    | <b>0,005</b> |

Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий;

Таблица 24

**Данные дискриминантного анализа цитологических и молекулярных маркеров в бронхиальном содержимом группы сравнения и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.**

| Показатели   | Группа сравнения,<br>n=32  | ХОБЛ,<br>n=83 |
|--|--|---------------|
| Правильность классификации, %  | 96,5   | 98,2          |
| Включенные в уравнение ЛДФ морфологические тесты, $\lambda$ Уилкса и статистическая значимость | Концентрация TNF- $\alpha$ в БС и ИМ, пг/мл;<br>$\lambda=0,71$ ; $p<0,001$ ; |               |
|  | Концентрация ИЛ-8 в БС и ИМ, пг/мл;<br>$\lambda=0,63$ ; $p<0,001$            |               |
| Характеристика уравнения ЛДФ   | $\lambda=0,54$ ; $F=35,20$ ; $p<0,0001$                                      |               |

Примечание: n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий; ЛДФ – линейная дискриминантная функция; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа, ИЛ-8 – интерлейкин 8;

**Резюме:** в результате иммуноферментного анализа были получены данные, свидетельствующие о значимых различиях между исследуемыми группами по ряду основных иммунологических маркеров. Результаты исследования указывают на высокую роль иммунологических маркеров в формировании и поддержании

патологической воспалительной реакции в формировании заболевания, что подтверждается современными данными литературы.

### **3.4.6. Сравнительный внутригрупповой анализ пациентов с ХОБЛ в отношении основных маркеров формирования заболевания.**

После выявления основных признаков формирования ХОБЛ среди биохимических, иммунологических, морфологических показателей был проведен сравнительный внутригрупповой анализ с целью поиска факторов, способствующих прогрессированию заболевания (табл. 25). Все пациенты с ХОБЛ были разделены на 2 подгруппы – с ОФВ1 более 50% (n=16) и менее 50% (n=33). Данный анализ показал достоверное различие исследуемых подгрупп по ряду признаков. В подгруппе пациентов с тяжелой ХОБЛ (ОФВ1 менее 50%) статистически достоверно были выше следующие показатели: удельный объем покровного эпителия (мм<sup>3</sup>/мм<sup>3</sup>, VVп.э.) и удельный объем базальных эпителиоцитов (VVбаз.э, мм<sup>3</sup>/мм<sup>3</sup>), что отражает более выраженную интенсивность регенеративных процессов и в целом эпителиальное ремоделирование бронхиальной стенки. Кроме того, были выявлены достоверные различия между исследуемыми группами на ультраструктурном уровне: в группе пациентов с более тяжелой ХОБЛ удельный объем эндоплазматической сети в бокаловидных и базальных эпителиоцитах (мкм<sup>3</sup>/мкм<sup>3</sup>, Vv эпс) был выше, чем в группе ХОБЛ с ОФВ1 выше 50% (табл. 25).

**Таблица 25**

#### **Результаты внутригруппового анализа пациентов с ХОБЛ в отношении основных маркеров формирования заболевания**

| Маркеры развития ХОБЛ   | Показатели маркеров развития ХОБЛ        |  | Уровень значимости различий |
|---|--|--|-----------------------------|
|   | Курильщики с ХОБЛ (ОФВ1 менее 50%), n=33 | Курильщики с ХОБЛ (ОФВ1 более 50%), n=16 |                             |
| Удельный объем покровного эпителия, мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> (VVп.э.) | 0,26 (0,20-0,36)                         | 0,2 (0,18-0,25)                          | <b>0,036</b>                |

|  |                       |                      |               |
|--|-----------------------|----------------------|---------------|
| Удельный объем базальных эпителиоцитов (VVбаз.э), мм <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup>     | 0,06 (0,05-0,08)      | 0,04 (0,02-0,06)     | <b>0,0037</b> |
| Нэ высота эпителия, (мкм)  | 73,42 (64,25-88,82)   | 75,5 (62,48 – 82,41) | 0,85          |
| Нб толщина базальной мембраны, (мкм)   | 2,74 (1,36-3,9)       | 2,4 (1,69 – 2,87)    | 0,49          |
| Суммарная плотность инфильтрата (на 1 мм <sup>2</sup> среза)                           | 274,9 (226,16-323,21) | 265,1 (206,3-291,74) | 0,47          |
| Плотность макрофагов (на 1 мм <sup>2</sup> среза)                                      | 85,4 (75 - 108,5)     | 86,32 (82,9 – 103,2) | 0,82          |
| Плотность нейтрофилов (на 1 мм <sup>2</sup> среза)                                     | 121,1 (115,8 - 179,2) | 124,6 (96,3 – 162,7) | 0,22          |
| Плотность межэпителиальных нейтрофилов (МН)  | 8,33 (6,26-10,02)     | 6,38 (3,25 – 11,5)   | 0,457         |
| Плотность межэпителиальных лимфоцитов (МЛ)   | 4,8 (3,25-5,83)       | 3,25 (1,25 – 6,25)   | 0,208         |
| Бронхиальный эпителий с признаками дистрофии (БЭСДМ, количество x 10 <sup>6</sup> /мл) | 0,04 (0,03-0,08)      | 0,08 (0,04-0,13)     | 0,34          |
| Макрофаги индуцированной мокроты (МКМ, количество x 10 <sup>6</sup> /мл)               | 0,50 (0,22-0,8)       | 0,31 (0,13-0,73)     | 0,33          |
| Нейтрофилы индуцированной мокроты (НФМ, количество x 10 <sup>6</sup> /мл)              | 1,62 (0,96-2,13)      | 1,2 (1,07 - 1,78)    | 0,46          |
| Активность эластазы, нмоль БАНЭ мин/мл (индуцированная мокрота)                        | 1,09 (0,546 - 3,99)   | 1,09 (0,546 - 2,83)  | 0,98          |
| Активность эластазы, нмоль БАНЭ мин/мл (бронхиальный смыв)                             | 1,177 (0,548 – 2,648) | 1,06 (0,422 – 1,42)  | 0,38          |
| α <sub>1</sub> -протеиназный ингибитор, ИЕ/мл (индуцированная мокрота)                 | 0,1 (0,06 – 2,648)    | 0,12 (0,068 – 0,819) | 0,87          |



|  |                       |                       |               |
|--|-----------------------|-----------------------|---------------|
| $\alpha_1$ -протеиназный ингибитор, ИЕ/мл (бронхиальный смыв)  | 0,102 (0,024 – 0,238) | 0,048 (0,022 – 0,238) | 0,97          |
| Удельный объем микропиноцитозных везикул, $V_v$ пиноц (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> ).                           | 0,18 (0,15 – 0,28)    | 0,22 (0,165- 0,29)    | 0,31          |
| Удельный объем, (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> ) митохондрий, $V_v$ мит. в базальных эпителиоцитах                | 0,11 (0,1-0,14)       | 0,11 (0,09 – 0,15)    | 0,36          |
| Удельный объем, (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> ) эндоплазматической сети в базальных эпителиоцитах, $V_v$ эпс.    | 0,1 (0,08 – 0,12)     | 0,09 (0,07 – 0,11)    | <b>0,0127</b> |
| Удельный объем, (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> ) митохондрий, $V_v$ мит. в бокаловидных эпителиоцитах             | 0,12 (0,09 – 0,16)    | 0,12 (0,08 – 0,14)    | 0,73          |
| Удельный объем, (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> ) эндоплазматической сети в бокаловидных эпителиоцитах, $V_v$ эпс. | 0,1 (0,07 – 0,12)     | 0,08 (0,06- 0,12)     | <b>0,015</b>  |

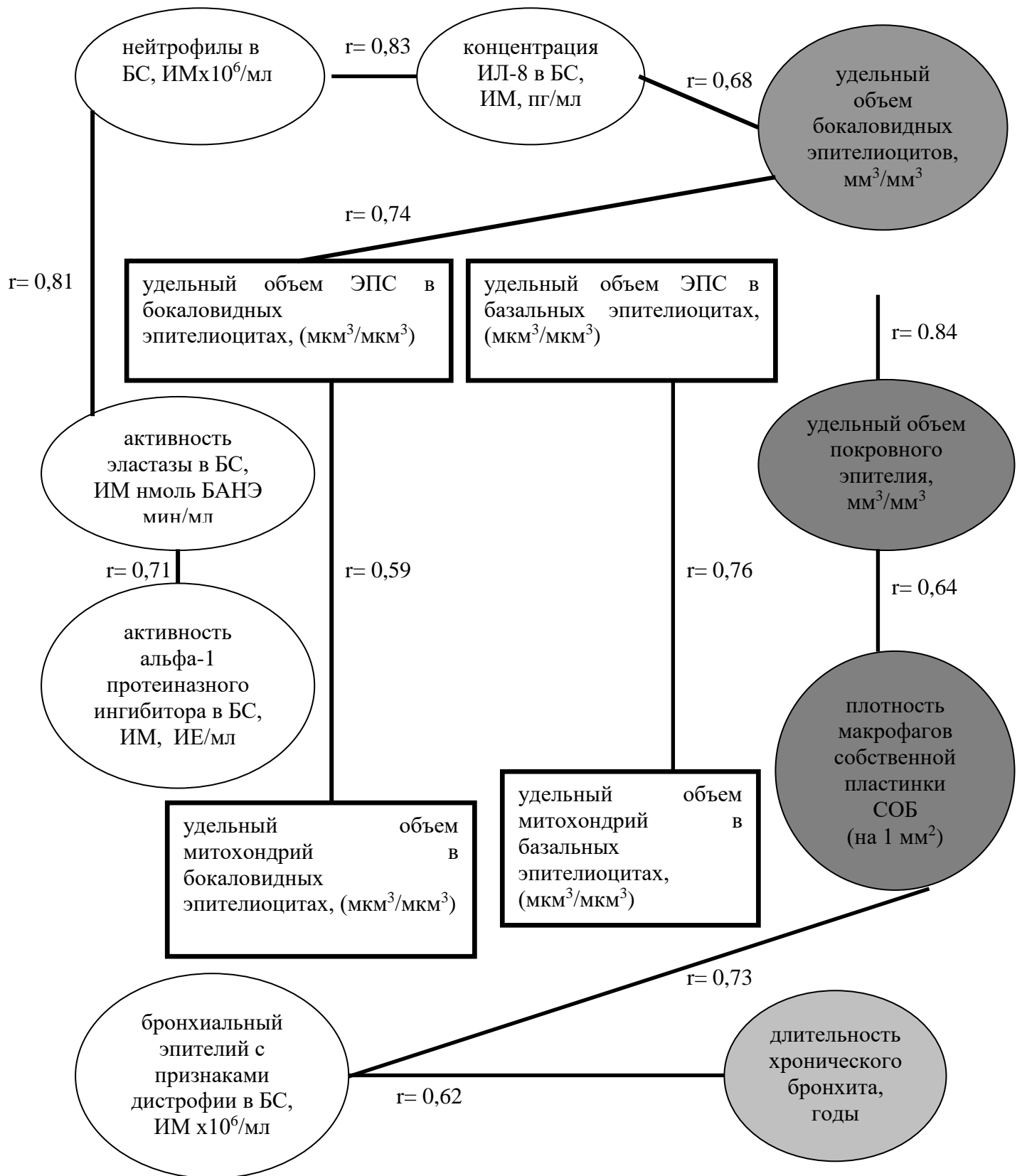
**Резюме.** Полученные данные позволяют предположить, что выявленные ультраструктурные изменения являются проявлением нарушения функционирования сложного гомеостатического механизма, известного как «ответ на мисфолдинг» (unfolded protein response, UPR). Данный механизм позволяет клетке преодолеть стресс эндоплазматического ретикулума, развивающегося под действием такого патогенного экзогенного фактора как курение и реализующегося на ультраструктурном уровне в виде расширения и перегрузки ЭПС неполноценными, а в ряде случаев и химически агрессивными белками. Таким образом, можно сделать предположение о ключевой роли стресса ЭПС и срыва UPR в патогенезе прогрессирования ХОБЛ, проявляющихся на морфологическом уровне патологическим ремоделированием эпителиальной стенки и дефектом репаративных процессов (увеличение плотности покровного эпителия и базальных эпителиоцитов).

### **3.5. Корреляционный анализ клинико-функциональных тестов, морфологических, иммунологических и биохимических параметров в слизистой оболочке бронхов в группе «здоровых» курильщиков и при ХОБЛ**

Для оценки взаимосвязи между клинико-функциональными, морфологическими, молекулярными параметрами в БС и ИМ, а также клетками воспалительного инфильтрата СОБ у пациентов с ХОБЛ и лиц группы сравнения нами проведен корреляционный анализ.

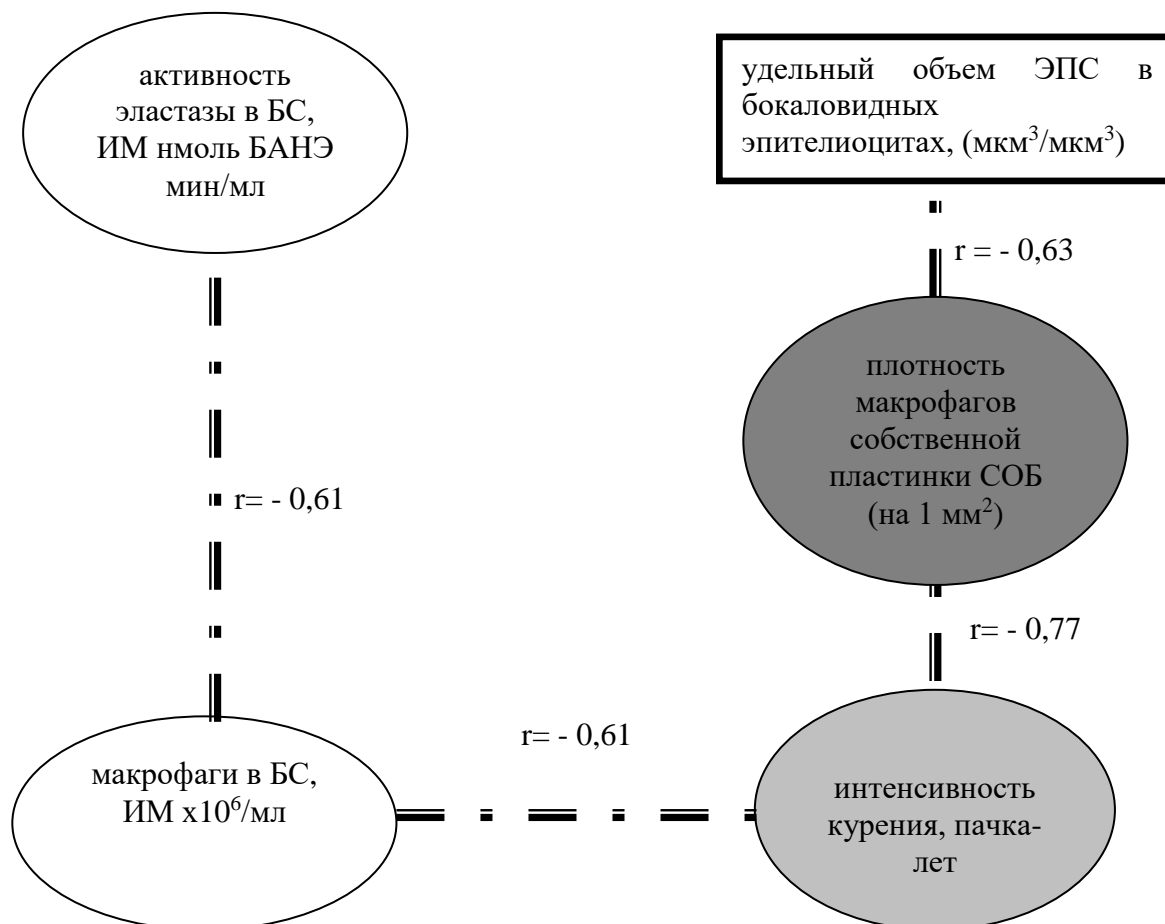
У курящих лиц без ХОБЛ наблюдались статистически значимые прямые взаимодействия между удельным объемом эндоплазматической сети, митохондрий в бокаловидных ( $p=0,0012$ ) и базальных эпителиоцитах ( $p=0,0002$ ), покровного эпителия ( $p=0,0082$ ), бокаловидных клеток ( $p=0,0172$ ), плотностью распределения макрофагов ( $p=0,0091$ ), количеством бронхиальных эпителиоцитов с признаками дистрофии ( $p=0,0039$ ), а также длительностью хронического бронхита; между количеством нейтрофилов в БС и ИМ ( $p=0,0025$ ), концентрацией интерлейкина-8 ( $p=0,0027$ ), активностью альфа-1 протеиназного ингибитора, активностью эластазы ( $p=0,0001$ ) в исследуемых биологических жидкостях (рис. 44), между концентрацией TGF- $\beta_1$  в ИМ и БС и интенсивностью курения (пачка-лет) ( $r=0,51$ ,  $p=0,02$ ).

Отрицательные корреляции в группе «здоровых» курильщиков были представлены взаимосвязями между активностью эластазы и количеством макрофагов в БС и ИМ ( $p=0,0018$ ), между плотностью макрофагов в собственной пластинке СОБ и удельным объемом ЭПС в бокаловидных экзокриноцитах ( $p=0,0028$ ), а также между интенсивностью курения (пачка-лет) и количеством МФ в ИМ, БС и плотностью данных клеток в собственной пластинке СОБ ( $p=0,002$ ) (рис. 45).



**Рисунок 44.** Результаты корреляционного анализа клинико-функциональных, биохимических и патоморфологических показателей у лиц группы сравнения ( $p < 0,05$ ),

— прямые взаимосвязи.



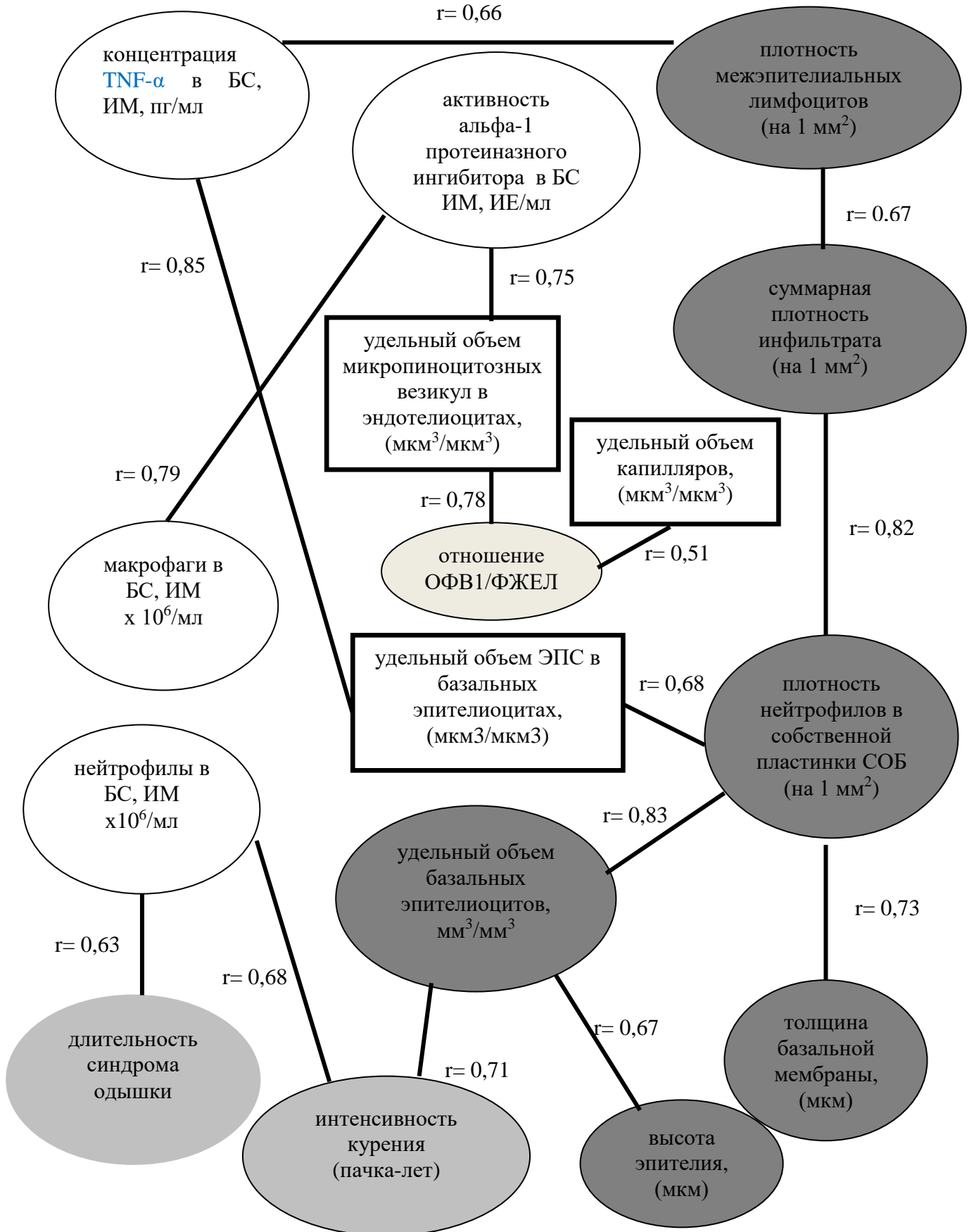
**Рисунок 45.** Результаты корреляционного анализа клинико-функциональных, биохимических и патоморфологических показателей у лиц группы сравнения ( $p < 0,05$ ), **==** ■ обратные взаимосвязи.

Анализ взаимосвязей внутри группы с ХОБЛ позволил выявить прямые корреляции между удельным объемом микропиноцитозных везикул в эндотелиоцитах ( $p=0,0023$ ), удельным объемом ЭПС в базальных эпителиоцитах ( $p=0,0045$ ), суммарной плотностью клеточного инфильтрата в  $1 \text{ мм}^2$  слизистой оболочки бронхов ( $p=0,0034$ ), плотностью распределения межэпителиальных лимфоцитов, в  $1 \text{ мм}^2$  среза ( $p=0,0027$ ), плотностью распределения нейтрофилов в  $1 \text{ мм}^2$  ( $p=0,0044$ ), толщиной базальной мембраны ( $p=0,0015$ ), высотой эпителия и объемной плотностью базальных эпителиоцитов ( $p=0,0021$ ), между концентрацией TNF- $\alpha$  в ИМ, БС и количеством нейтрофилов ( $p=0,0039$ ), макрофагов ( $p=0,0091$ ) в исследуемых биологических жидкостях (рис. 46).

В группе с ХОБЛ были выявлены отрицательные взаимосвязи между удельным объемом эндоплазматической сети, митохондрий в бокаловидных

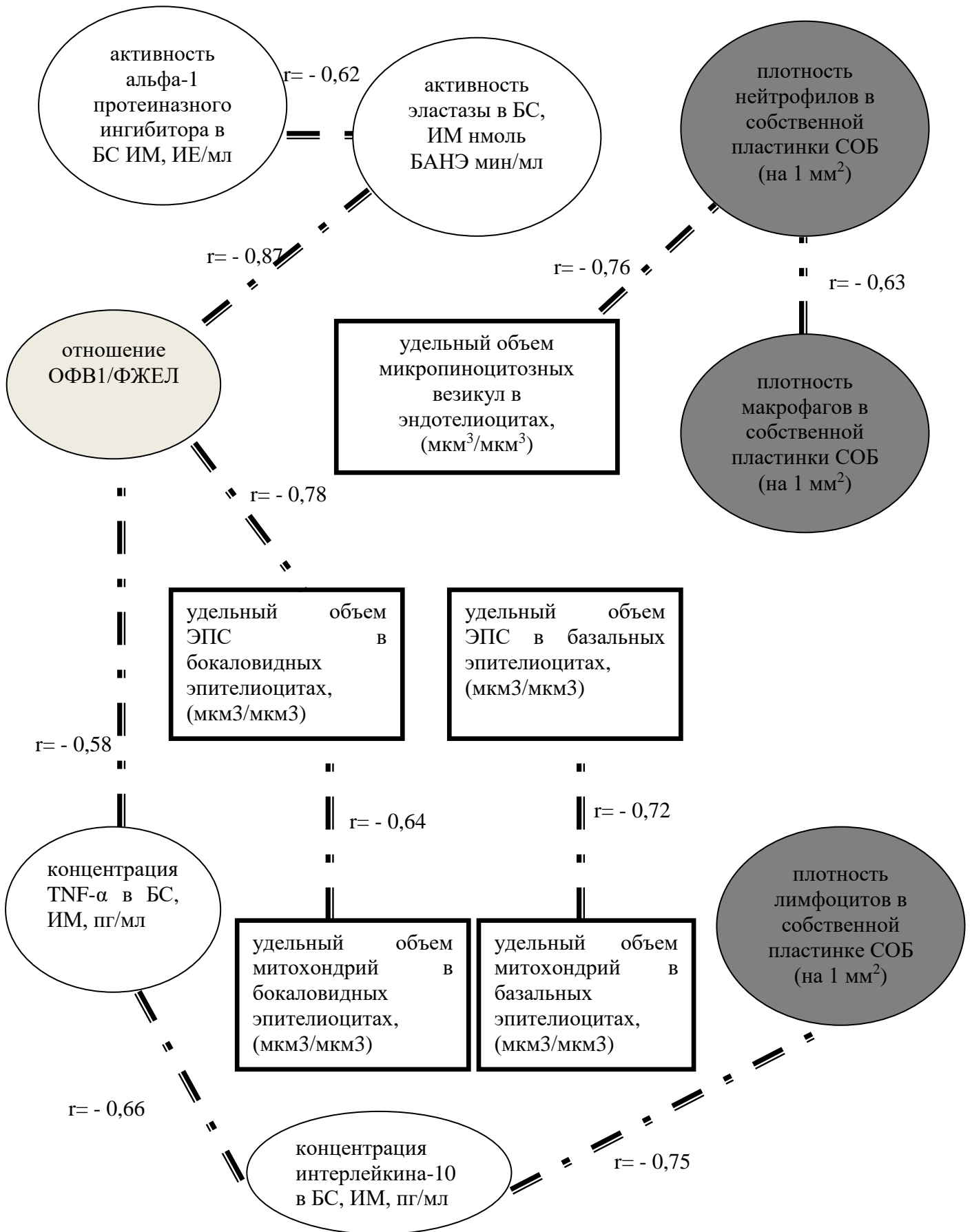
( $p=0,0011$ ) и базальных эпителиоцитах ( $p=0,0082$ ), удельным объемом МПВ в эндотелиоцитах ( $p=0,0064$ ), плотностью распределения нейтрофилов ( $p=0,0064$ ), макрофагов в  $1 \text{ мм}^2$  СОБ ( $p=0,0072$ ), а также концентрацией TNF- $\alpha$ , интерлейкина-10 ( $p=0,0034$ ), активностью альфа-1 протеиназного ингибитора, эластазы в ИМ и БС ( $p=0,0001$ ) (рис. 47).

При проведении корреляционного анализа в группе ХОБЛ были выявлены достоверные взаимосвязи ряда важных клинико-функциональных показателей с достоверными морфологическими, иммунологическими и биохимическими изменениями в СОБ под воздействием табачного дыма, обнаруженными в результате исследования: прямые корреляции между длительностью синдрома одышки и концентрацией TGF- $\beta_1$  в ИМ и БС ( $r=0,46$ ,  $p=0,02$ ), активностью эластазы в ИМ, БС ( $r=0,35$ ,  $p=0,04$ ), количеством нейтрофилов в ИМ и БС (рис. 46); между частотой обострения заболевания и объемной плотностью соединительной ткани в СОБ ( $r=0,47$ ,  $p=0,009$ ), активностью эластазы в ИМ, БС ( $r=0,37$ ,  $p=0,03$ ); между ОФВ1 (после БД) и количеством МФ в ИМ, БС ( $r=0,42$ ,  $p=0,03$ ); между соотношением ОФВ1/ФЖЕЛ и удельным объемом МПВ ( $r=0,78$ ,  $p=0,000143$ ), УО капилляров,  $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$  ( $r=0,51$ ,  $p=0,000126$ ); между интенсивностью курения (пачка-лет) и удельным объемом базальных эпителиоцитов (рис. 46); инструментально подтвержденной легочной гипертензией и плотностью соединительной ткани в собственной пластинке СОБ ( $r=0,51$ ,  $p=0,012$ ). А также обратные корреляции: между соотношением ОФВ1/ФЖЕЛ и концентрацией TNF- $\alpha$  в ИМ и БС (рис. 47); между ОФВ1 (после БД) и плотностью фибробластов ( $r=-0,54$ ,  $p=0,002$ ), удельным объемом базальных эпителиоцитов ( $r=-0,37$ ,  $p=0,04$ ); между интенсивностью курения (пачка-лет) и плотностью фибробластов ( $r=-0,38$ ,  $p=0,009$ ).



**Рисунок 46.** Результаты корреляционного анализа клинико-функциональных, биохимических и патоморфологических показателей у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких ( $p < 0,05$ )

— прямые взаимосвязи



**Рисунок 47.** Результаты корреляционного анализа клинико-функциональных, биохимических и патоморфологических показателей у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких ( $p < 0,05$ ),  
 == == обратные взаимосвязи.

### *Резюме.*

При корреляционном анализе выявленные нами обратные взаимосвязи между удельным объемом ЭПС и митохондрий в базальных и бокаловидных эпителиоцитах в группе с ХОБЛ свидетельствуют об развитии митохондриальной дисфункции и истощении основного энергетического аппарата клеток (дегенеративные изменения митохондрий подтверждаются при морфологическом исследовании) под воздействием повышенной биосинтетической нагрузки в различных популяциях бронхиальных эпителиоцитов.

По результатам корреляционного анализа подтверждены признаки нарушения функционирования сложного гомеостатического механизма, известного как «ответ на мисфолдинг» (unfolded protein response, UPR) – разносторонние взаимосвязи удельного объема ЭПС в бокаловидных и базальных эпителиоцитах с другими тканевыми, клеточными и молекулярными параметрами СОБ. Так, в группе ХОБЛ нужно отметить обратную взаимосвязь удельного объема ЭПС бокаловидных клеток и важного клиническо-функционального показателя – отношения ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ, что подтверждает гипотезу о роли стресса ЭПС как одного звеньев патогенеза развития заболевания.

Также в группе ХОБЛ были выявлены статистически значимые корреляции в отношении удельного объема МПВ: отрицательные в отношении плотности нейтрофилов собственной пластинки СОБ и положительные с ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ, с активностью альфа-1 протеиназного ингибитора в ИМ и БС. На фоне уменьшения УО МПВ в эндотелиальных клетках капилляров СОБ основной группы в сравнении с группой «здоровых» курильщиков полученные данные свидетельствуют о ключевом значении данных доминантных признаков в нарушении транскапиллярного обмена и трофических процессов в бронхиальной стенке при развитии ХОБЛ.

В группе ХОБЛ значимые взаимосвязи с цитологическими, иммунологическими показателями ИМ и БС (ИЛ -10, TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta_1$ ) и морфометрическими маркерами эпителиального ремоделирования были получены в отношении лимфоцитов и нейтрофилов, что свидетельствует о



значимой роли данных клеточных популяций в дисбалансе про- и противовоспалительных цитокинов и персистенции патологического воспаления бронхиального дерева при развитии ХОБЛ. Отдельно стоит отметить разносторонние корреляции количества макрофагов в ИМ, БС и их плотности в собственной пластинке СОБ, позволяют говорить о одной из ключевых ролей данной клеточной популяции как в развитии ХОБЛ, так и в обеспечении резистентности к заболеванию.

При проведении корреляционного анализа были выявлены разносторонние взаимосвязи между тканевыми, клеточными и молекулярными маркерами реакции СОБ на воздействие табачного дыма и клинико-функциональными показателями, такими как длительность синдрома одышки, частота обострения заболевания, интенсивность курения, ОФВ1 (после БД), ОФВ1/ФЖЕЛ, легочная гипертензия. Данный факт отражает прямое патологическое воздействие табачного дыма на структурные изменения бронхиальной стенки при формировании ХОБЛ и свидетельствует о значимой роли данных маркеров в формировании резистентности у «здоровых» курильщиков.

#### Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время имеются немногочисленные комплексные исследования механизмов, обуславливающих устойчивость к развитию ХОБЛ у курильщиков. В связи с тем, что в научных дискуссиях о формировании «резистентности» к воздействию табачного дыма преобладают биохимические, иммунологические и морфологические факторы, мы оценивали возможность реализации каждого из этих механизмов. Поиск патоморфологического базиса структурных изменений в бронхиальной стенке у больных ХОБЛ, развивающегося на фоне курения, служит потенциальной основой для разработки новых патогенетических подходов к диагностике и лечению данной нозологии.

Для выявления факторов развития резистентности к воздействию табачного дыма у курильщиков, страдающих и не страдающих ХОБЛ было реализовано цитологическое, биохимическое и иммунологическое исследование ИМ и БС, в том числе с учетом возможности скринингового анализа данных биологических материалов. Тканевые, клеточные и молекулярные изменения в бронхиальной стенке, которые приводили к развитию и прогрессированию заболевания, анализировались с помощью морфологического, морфометрического и ультраструктурного исследования СОБ.

В работе были получены данные, подтверждающие, что у курильщиков, страдающих ХОБЛ, в бронхиальной стенке имеется **дисбаланс в протеиназ-антипротеиназной системе**, реализующийся в повышении функциональной активности эластазы и снижении антипротеиназной защиты ингибитора, что подтверждается обратной корреляцией между исследуемыми маркерами в ИМ и БС (рис 47). По результатам дискриминантного анализа оценке функциональной активности эластазы и альфа-1 протеиназного ингибитора в ИМ и БС принадлежит ведущая роль в формировании структурных изменений в бронхиальной стенке у курильщиков с ХОБЛ (табл. 4,5). При длительной персистенции воспаления воздействие нейтрофильной эластазы, а также оксидантов приводит к деструкции биологических мембран, в результате чего развивается выраженное нарушение функции внутриклеточных органоидов в

эпителиоцитах СОБ с последующим формированием регенераторно-пластического дефицита, что было подтверждено как в нашей работе, так и в ряде других исследований [5, 30, 32, 56, 57, 58, 69, 75, 96, 107, 108, 110, 157].

Результаты наших исследований у курящих пациентов без ХОБЛ показали одновременное увеличение функциональной активности эластазы и альфа-1 протеиназного ингибитора, что подтверждается прямой корреляцией между исследуемыми маркерами в ИМ и БС (рис 44). Видимо, у данной группы лиц высокая функциональная активность эластазы, индуцируемая факторами табачного дыма, нивелируется альфа-1 протеиназным ингибитором, который высвобождается в том числе и из альвеолярных макрофагов, что является одним из механизмов, защищающих СОБ и препятствующих развитию ХОБЛ [112].

У курильщиков с ХОБЛ, напротив, нарушение структуры и функции молекулы ингибитора ассоциировано не только с воздействием сигаретного дыма, но и со значимо повышенной активностью протеиназ, миелопероксидазы, активных форм кислорода, высвобождающихся из нейтрофилов, число которых повышено во всех исследуемых жидкостях. Вышеперечисленные вещества способны инактивировать активный центр антипротеиназы, что вызывает подавление ее ингибиторных свойств [20, 23]. Более того, молекулы, образовавшиеся при деструкции  $\alpha 1$ -ПИ (пептид С-31), обладают провоспалительными свойствами, стимулируют хемотаксис нейтрофилов, их адгезию, дегрануляцию, продукцию активных форм кислорода, что усиливает воспалительный процесс в бронхиальной стенке [36]. Подтверждением этому служат полученные нами данные: у курящих пациентов, страдающих ХОБЛ, имеет место выраженное увеличение количества нейтрофилов в ИМ и БС, а также в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов (табл. 6,7,11,12). В результате дегградации  $\alpha 1$ -ПИ подавляется его активность, что сопровождается неконтролируемым функционированием протеиназ и происходящим вследствие этого повреждением соединительной ткани собственной пластинки СОБ и паренхимы легких, с уменьшением внутренней поверхности альвеол, развитием эмфиземы [90, 215]. Возможно, нарушение ингибиторных свойств данного белка

у курящих пациентов с ХОБЛ может быть связано в том числе и с дефектами его синтеза в альвеолярных макрофагах, что подтверждается прямой корреляцией между альвеолярными макрофагами в ИМ, БС и активностью  $\alpha 1$ -ПИ у исследуемых пациентов (рис. 46).

Обнаруженное в нашем исследовании увеличение функциональной активности эластазы у курильщиков с ХОБЛ и воздействие ее на развитие ремоделирования бронхиальной стенки подтверждается отрицательной корреляцией между активностью данного фермента в бронхиальном секрете и отношением ОФВ1/ФЖЕЛ (рис. 47), а также прямыми корреляциями с такими клиническими маркерами, как частота обострений заболевания ( $r=0,37$ ,  $p=0,03$ ) и длительность синдрома одышки ( $r=0,35$ ,  $p=0,04$ ).

При цитологическом исследовании ИМ и БС в группе больных ХОБЛ и в группе сравнения были получены статистически значимые различия по ряду показателей. Нами установлено, что более высокая клеточность ИМ и БС при ХОБЛ, по сравнению с курильщиками, не страдающими этой нозологией, связана с увеличением абсолютного количества нейтрофильных лейкоцитов, лимфоцитов, бронхиальных эпителиоцитов с признаками дистрофии на фоне снижения общего числа макрофагов (табл. 6,7).

При морфометрическом исследовании бронхобиоптатов у курящих пациентов с ХОБЛ нами обнаружены аналогичные изменения плотности клеточного инфильтрата собственной пластинки СОБ, за исключением плотности макрофагов (табл. 11, 12).

По данным дискриминантного анализа нейтрофилам, макрофагам и межэпителиальным лимфоцитам бронхов принадлежит ведущая роль в структурной перестройке бронхиальной стенки у курильщиков с ХОБЛ (таблицы 14, 15). Согласно данным литературы, при развитии ХОБЛ у курильщиков ключевая роль принадлежит клеточному и функциональному дисбалансу между гранулоцитами и макрофагами, что сопровождается структурными изменениями СОБ, реализующееся в виде увеличения количества клеток реснитчатого эпителия с признаками дистрофии в ИМ и БС [20, 21, 32, 36, 129, 130, 218].

Роль нейтрофилов в патогенезе ХОБЛ изучена достаточно, а участие различных популяций макрофагов в настоящее время активно исследуется и обсуждается [24, 47, 113, 216]. Множество научных работ посвящено анализу морфофункционального состояния макрофагов бронхиальной стенки у курильщиков с ХОБЛ, лиц бросивших курить и здоровых не курящих людей, и лишь единичные исследования оценивают состояние этих клеток у «здоровых» курильщиков. По результатам наших исследований у курильщиков с ХОБЛ, по сравнению с курильщиками без ХОБЛ, имеет место статистически значимое снижение количества макрофагов в ИМ и БС на фоне увеличения их плотности в собственной пластинке СОБ (таблицы 6,7,11), что, вероятно, происходит за счет субпопуляции макрофагов  $M_2$  [268]. По данным литературы даже после прекращения курения отмечается лишь частичная поляризация фенотипа макрофагов в субпопуляции  $M_2$  без изменения баланса про- и противовоспалительных цитокинов [35, 216]. Таким образом, при длительном воздействии табачного дыма у курильщиков с ХОБЛ в СОБ происходит снижение защитно-барьерной и фагоцитарной функции макрофагов, а также стимулируется их участие в процессах ремоделирования бронхиальной стенки (непосредственно через продукцию факторов роста TGF- $\beta$  и FGFs). Снижение функциональной активности макрофагов, наблюдаемое нами у курящих пациентов с ХОБЛ, нашло свое отражение на ультраструктурном уровне появлением клеток с разрушением цитоплазматической мембраны, признаками дегенерации и сниженным числом фагосом, что подтверждается и данными литературы [2, 3, 44, 45, 46, 47]. Важно отметить, что инфильтрация СОБ макрофагами у курильщиков с ХОБЛ потенцируется более длительным сроком жизни этих клеток в бронхах, что согласно данным литературы и связано с высокой концентрацией ГМ-КСФ [194, 195, 196, 197, 209, 210].

При проведении корреляционного анализа были выявлены прямые взаимосвязи между общим числом МФ в ИМ, БС и ОФВ1 (после БД) ( $r=0,42$ ;  $p=0,03$ ) у курильщиков с ХОБЛ, а также обратные - между общим количеством МФ в бронхиальном содержимом и интенсивностью курения (индекс пачка-лет)

(рис. 45) у «здоровых» курильщиков. Данный факт подтверждает одну из ключевых ролей макрофагов в защите бронхиального дерева от воздействия табачного дыма, а истощение их морфофункционального ресурса, вероятно, может приводить к развитию ХОБЛ.

У курящих пациентов с ХОБЛ обнаружено увеличение плотности лимфоцитов в собственной пластинке СОБ, в том числе за счет межэпителиальных форм (табл. 11, 12). Согласно данным литературы количество лимфоцитов в бронхиальной стенке при ХОБЛ увеличивается, преимущественно, за счет субпопуляции  $CD8^+$ -клеток, которые локализуются межэпителиально [52, 238, 239]. По данным дискриминантного анализа при ХОБЛ именно эти клетки, наряду с нейтрофилами, играют важную роль в ремоделировании бронхиальной стенки (табл. 15). Цитотоксическое действие межэпителиальных лимфоцитов (преимущественно  $CD8^+$ -лимфоцитов) на клетки бронхиального эпителия у курильщиков с ХОБЛ подтверждается большим количеством эпителиоцитов с признаками дистрофии, в которых на ультраструктурном уровне определялись ядра неправильной формы с конденсированным хроматином, цитоплазматический матрикс с признаками деградации, а также расширение и вакуолизация гранулярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи.

Кроме прямого цитотоксического действия на клетки бронхиального эпителия,  $CD8^+$ -лимфоциты продуцируют  $TNF-\alpha$ , который увеличивает высвобождение ИЛ-8 из нейтрофилов и снижает концентрацию ИЛ-10, что у курящих пациентов сопровождается развитием необратимой бронхиальной обструкции и приводит к формированию ХОБЛ [107, 108, 184]. В исследуемой группе больных ХОБЛ это подтверждается данными корреляционного анализа: положительной взаимосвязью между плотностью межэпителиальных лимфоцитов и концентрацией  $TNF-\alpha$  в БС и ИМ (рис. 46), а также отрицательными корреляциями между концентрацией  $TNF-\alpha$  и ИЛ-10 в БС и ИМ, концентрацией  $TNF-\alpha$  в ИМ и БС и ключевым клинико-функциональным показателем - ОФВ1/ФЖЕЛ (рис. 47), что свидетельствует о значимой роли лимфоцитов и  $TNF-\alpha$  в развитии ХОБЛ. При корреляционном анализе в группе сравнения также

выявлена прямая взаимосвязь между концентрацией TNF- $\alpha$  в БС и ИМ и интенсивностью курения, пачка-лет ( $r=0,51$ ,  $p=0,02$ ). В целом при иммунологическом исследовании было выявлено, что в бронхиальном секрете курильщиков с ХОБЛ ИЛ-8 выше в 120 раз, TNF- $\alpha$  - в 5 раз, TGF- $\beta_1$  - в 7 раз, ИНФ- $\gamma$  - в 5 раз, а ИЛ-10 снижен в 10 раз по сравнению с группой «здоровых» курильщиков. При этом дискриминантный анализ подтверждает доминирующую роль в развитии ХОБЛ повышенной концентрации TNF- $\alpha$ , ИЛ-8 в ИМ и БС (табл. 24). Полученные результаты указывают, что в группе курильщиков с ХОБЛ, в слизистой оболочке бронхов определяется выраженная воспалительная инфильтрация на фоне дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов, в связи с чем, воспаление в бронхиальном дереве приобретает автономный характер, и заболевание продолжает прогрессировать даже при исключении воздействия внешних факторов, в частности табачного дыма.

Согласно данным S. Isajevs [111] иммунорегуляторное действие TGF- $\beta_1$  сопровождается активизацией пула Т-лимфоцитов с ростом их цитотоксического эффекта, а также данный ростовой фактор стимулирует созревание и дифференцировку фибробластов, в том числе выработку ими коллагеновых волокон и основного вещества соединительной ткани, что приводит к развитию фиброза собственной пластинки СОБ с преимущественно периваскулярной локализацией и сужением просвета сосудов. В нашей работе было обнаружено как значительное превышение концентрации TGF- $\beta_1$  у курильщиков с ХОБЛ в ИМ и БС по сравнению с группой «здоровых» курильщиков (72,43 пг/мл и 9,47 пг/мл соответственно,  $p=0,005$ ), так и увеличение плотности фибробластов (табл. 11) с одновременным повышением объемной плотности соединительной ткани (рис. 43). Фиброз бронхиальной стенки у курильщиков с ХОБЛ имел, преимущественно, периваскулярную локализацию (рис. 38), что отражалось в появлении большого количества капилляров с морфологическими признаками сужения просвета с последующей редукцией микрососудистого русла, и подтверждалось как на светооптическом (УО капилляров 0,06 мм<sup>3</sup>/мм<sup>3</sup> и 0,09 мм<sup>3</sup>/мм<sup>3</sup>, соответственно,  $p<0,05$ ), так и на ультраструктурном уровнях (УО

капилляров 0,44 (0,28-0,56 мкм<sup>3</sup>/мкм<sup>3</sup>) и 0,69 (0,36-0,88) мкм<sup>3</sup>/мкм<sup>3</sup> соответственно,  $p=0,004$ ).

При морфометрическом исследовании СОБ у курильщиков с ХОБЛ, в отличие от группы «здоровых» курильщиков, были обнаружены маркеры эпителиального ремоделирования - толщина базальной мембраны, высота эпителиального пласта, объемная плотность базальных эпителиоцитов, фибробластов и соединительной ткани. Вышеуказанные маркеры положительно коррелировали с плотностью нейтрофилов в собственной пластинке СОБ, суммарной плотностью инфильтрата, концентрацией TNF- $\alpha$  в ИМ и БС (рис. 46.)

Важно отметить, что в группе пациентов с ХОБЛ по данным корреляционного анализа были выявлены достоверные связи ряда важных клинико-функциональных показателей с выявленными морфологическими, иммунологическими изменениями в СОБ, указанными выше. Нами обнаружены прямые корреляции между длительностью синдрома одышки и концентрацией TGF- $\beta_1$  в ИМ и БС ( $r=0,46$ ,  $p=0,02$ ), количеством нейтрофилов в ИМ и БС (рис. 46); между частотой обострения заболевания и объемной плотностью соединительной ткани в СОБ ( $r=0,47$ ,  $p=0,009$ ); между интенсивностью курения (пачка-лет) и удельным объемом базальных эпителиоцитов (рис. 46). А также обратные корреляции между соотношением ОФВ1/ФЖЕЛ и концентрацией TNF- $\alpha$  в ИМ и БС (рис. 47); между ОФВ1 (после БД) и плотностью фибробластов ( $r= -0,54$ ,  $p=0,002$ ), удельным объемом базальных эпителиоцитов ( $r= -0,37$ ,  $p=0,04$ ); между интенсивностью курения (пачка-лет) и плотностью фибробластов ( $r= -0,38$ ,  $p=0,009$ ). Полученные нами результаты указывают на значимую роль данных параметров СОБ в процессах эпителиального ремоделирования бронхиальной стенки, что у курильщиков приводит к клиническим проявлениям ХОБЛ.

Дисциркуляторные расстройства, определяющиеся у курящих пациентов с ХОБЛ, проявляются не только в редукции микроциркуляторного русла, но и в нарушении ультраструктурной организации капиллярного звена и более выражены, чем в группе сравнения. Обнаруженные нами изменения в капиллярах



у курильщиков с ХОБЛ были представлены статистически значимым по отношению к группе сравнения снижением УО микропиноцитозных везикул на люминальной поверхности эндотелиоцитов капилляров собственной пластинки СОБ с одновременным уменьшением диаметра гранул Вейбеля – Палладе (табл. 21). Эти изменения в эндотелиоцитах капилляров легких у пациентов с ХОБЛ отражают признаки эндотелиальной дисфункции и подтверждаются данными дискриминантного анализа, согласно которым удельный объем микропиноцитозных везикул ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ) является ведущим патофизиологическим звеном сосудистого ремоделирования, наблюдаемого у пациентов с ХОБЛ при воздействии табачного дыма (табл. 22).

Известно, что в гранулах Вейбеля – Палладе находится множество БАВ, таких как фактор Виллебранда, эндотелин-1, Р-селектин. Массивное высвобождение содержимого данных гранул при курении, ассоциированном с развитием ХОБЛ, обуславливает увеличение концентрации фактора Виллебранда в сыворотке крови, что может приводить к резкому повышению вазомоторного тонуса и усилению тромбообразования [235, 237]. В нашем исследовании это отражается в уменьшении УО капилляров собственной пластинки СОБ, а также в повышении доли сосудов с ультраструктурными признаками реологических расстройств - стаз, сладж, тромбоз (рис. 42). Эти морфологические изменения нередко приводят к расстройству процессов перфузии через микрососуды и блокаде транскапиллярного обмена. Таким образом, у курильщиков с ХОБЛ развитие эндотелиальной дисфункции с последующим изменением сосудов микроциркуляторного русла в бронхиальной стенке вносит значимый вклад в формирование необратимой бронхиальной обструкции и хронической легочной гипертензии. Это подтверждается положительными корреляциями: между ОФВ1/ФЖЕЛ и удельным объемом МПВ ( $r=0,78$ ,  $p=0,000143$ ), УО капилляров,  $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$  ( $r=0,51$ ,  $p=0,000126$ ); между инструментально подтвержденной легочной гипертензией и плотностью соединительной ткани в собственной пластинке СОБ ( $r=0,51$ ,  $p=0,012$ ). Полученные морфометрические данные подтверждают результаты работ, направленных на исследование вопроса

расстройств микроциркуляции, как звена патогенеза ХОБЛ [234, 235, 236, 237]. Так, по данным Кузубовой Н.А. и др. было показано, что у больных ХОБЛ даже на ранней стадии заболевания нарушена вазорегулирующая функция эндотелия, нарастающая по мере прогрессирования патологического процесса, сопровождающаяся повышением эндотелина-1 в плазме крови и приводящая к формированию хронического легочного сердца [236].

Некоторые авторы считают, что структурная перестройка дыхательных путей у курильщиков при ХОБЛ связана с изменением функциональной морфологии тучных клеток. В нашей работе у этой группы пациентов регистрировалась более высокая плотность популяций тучных клеток в собственной пластинке СОБ с одновременным снижением среднего цитохимического коэффициента. Считается, что высокогранулированные тучные клетки, локализуются у курящих пациентов с ХОБЛ, преимущественно, субэпителиально и периваскулярно. Эти клетки способны вырабатывать триптазу и химазу – ферменты, которые разрушают коллаген IV базальной мембраны [89, 91, 227, 230, 231, 263]. У курящих пациентов с ХОБЛ это подтверждается снижением в СОБ плотности высокогранулированных ТК и повышением общего числа низкогранулированных форм, что выявляется и на ультраструктурном уровне. При электронно-микроскопическом исследовании в собственной пластинке СОБ обнаружена клеточная кооперация «фибробласт-тучная клетка», что может объяснить механизм увеличения толщины базальной мембраны и фиброза бронхиальной стенки у курящих пациентов с ХОБЛ. Фибробласты вырабатывают в большом количестве коллаген I, III, VIII, который входит в состав волокнистых структур, а тучные клетки синтезируют компоненты основного вещества (фибронектин, тенасцин), входящие в состав базальной мембраны и соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки бронхов. В этой связи взаимодействия между клетками фибробластического ряда и тучными клетками в бронхиальной стенке у курильщиков, страдающих ХОБЛ, можно интерпретировать как защитно-приспособительную реакцию, ориентированную на формирование барьера для инородных веществ в виде

утолщения базальной мембраны. С другой стороны, «разволокнение» базальной мембраны представляет собой важный патогенетический механизм эпителиально-мезенхимальных дисфункций, приводящих к формированию необратимой бронхиальной обструкции с выраженным снижением отношения ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ. Кроме того, в исследованиях Soltani A. et al. была показана роль тучных клеток в СОБ в стимулировании неоангиогенеза у пациентов с ХОБЛ [231].

Морфофункциональное изменение клеток стромы, а также сосудистое ремоделирование бронхиальной стенки у курящих пациентов с ХОБЛ приводит к выраженной структурной дезорганизации эпителия, проявляющейся атрофией реснитчатых эпителиоцитов, бокаловидноклеточной гипоплазией и плоскоклеточной метаплазией. Реснитчатые эпителиоциты СОБ у курильщиков с ХОБЛ уменьшены в размерах, в эпителиальном пласте снижено число бокаловидных клеток (соотношение к реснитчатым эпителиоцитам - 1:6, 1:7). Изменение процессов слизиобразования у курильщиков с ХОБЛ, проявлялось уплотнением, полиморфизмом и осмиофилией секреторных гранул в бокаловидных клетках в сочетании с расширением цистерн ЭПС и уменьшением УО митохондрий, что приводило к нарушению процессов экстрюзии слизи, сопровождающееся развитием необратимой бронхиальной обструкции, которая отражается в том числе и в низких показателях отношения ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ. Данные патоморфологические изменения подтверждаются отрицательной корреляцией ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ с удельным объемом ЭПС в бокаловидных экзокриноцитах (рис. 47).

При изучении биоптатов СОБ у пациентов с ХОБЛ и у «здоровых» курильщиков также был сделан акцент на выявление метаплазии, поскольку она с одной стороны является компенсаторной реакцией организма, направленной на защиту эпителиального пласта от воспалительных агентов, а с другой стороны может быть расценена как предопухолеватая трансформация бронхиального эпителия. По данным нашего исследования в бронхобиоптатах у курильщиков с ХОБЛ в 12,2 % случаев очаги атрофии эпителия и желез СОБ чередовались с участками плоскоклеточной метаплазии. В некоторых исследованиях

плоскоклеточная метаплазия рассматривается как пролиферативно-клеточный вариант перестроения бронхиального эпителия, ассоциированный с истощением структурно-метаболических резервов клетки и уменьшением их белок-синтетической функции [37, 234, 235]. При длительном анамнезе ХОБЛ плоскоклеточная метаплазия и атрофия бронхиального эпителия в СОБ являются заключительными стадиями в цикле возможных преобразований реснитчатого эпителия. При этом по данным Lappere T.S et al. было показано, что выраженность дистрофических изменений и метаплазии бронхиального эпителия дыхательных путей статистически значимо ниже у пациентов с ХОБЛ, прекративших курение [222].

Таким образом, формирование ХОБЛ у курильщиков ассоциировано с увеличением высоты эпителиального пласта и объемной плотности покровного эпителия, за счет базальных эпителиоцитов; с увеличением плотности клеточного инфильтрата СОБ преимущественно за счет нейтрофилов, макрофагов, межэпителиальных лимфоцитов. У этой группы пациентов в СОБ нами обнаружены признаки сосудистого ремоделирования и эндотелиальной дисфункции на фоне выраженного цитокинового дисбаланса.

В литературе встречается небольшое количество исследований, направленных на сравнительную **ультраструктурную характеристику бронхиальной стенки** у курильщиков с ХОБЛ и у курильщиков, устойчивых к развитию заболевания. В последнее время ряд исследований обращены в сторону выяснения роли митохондриальной дисфункции при развитии ХОБЛ при длительном воздействии табачного дыма.

Окислительный стресс и нарушения антиоксидантной защиты, развивающихся на фоне курения может приводить к повреждению митохондрий с последующим нарушением их функционирования. В исследованиях Hoffmann R.F, Naga H. и др. было показано, что длительное воздействие сигаретного дыма вызывает устойчивые структурные изменения в этих органеллах, отражающиеся в фрагментации, ветвлении и изменении количества крист, что сопровождается разрушением митохондриальной ДНК, ее мембранных липидов и белков [120,

121]. Все вышеперечисленные процессы могут вызвать окислительную модификацию, блокирование системы окислительного фосфорилирования, что влияет на энергетический обмен эпителиоцитов СОБ. Авторы считают, что обнаруженные изменения являются лишь частично обратимыми и при исчезновении экспозиции табачного дыма не исчезают полностью.

Длительное воздействие табачного дыма приводит к стойкой митохондриальной дисфункции и к необратимым структурным изменениям, что может быть триггером в развитии ХОБЛ [120, 121, 122, 123, 124]. При ультраструктурном исследовании бронхиальных эпителиоцитов у курящих пациентов с ХОБЛ нами обнаружены признаки митохондриальной дисфункции - появление гетерогенных популяций митохондрий с уплотнением и просветлением митохондриального матрикса (рис. 27, 28), что подтверждалось и данными морфометрического исследования: в бокаловидных и базальных эпителиоцитах СОБ определялось снижение УО митохондрий на фоне увеличения УО ЭПС в сравнении с группой курильщиков без ХОБЛ. Полученные результаты в отношении ЭПС могут отражать как повышенную белок-синтетическую функцию в этих клетках, так и являться признаками нарушения сложного гомеостатического механизма, известного как «ответ на мисфолдинг» (unfoldedproteinresponse, UPR).

По данным литературы для формирования нормальной конформации и созревания структуры белка обязательно определенное соответствие между белок-синтетической нагрузкой, функциональной активностью и «вместимостью» ЭПС. В случае нарушения этого баланса происходит перегрузка ЭПС, мисфолдинг и, как результат, избыточное скопление в просвете сети неактивных и даже агрессивных белков, а при прогрессировании процесса – гибель клетки. Основное назначение UPR - это компенсация стресса эндоплазматической сети, восстановление гомеостаза и, в конечном счете, предотвращение гибели клетки [109]. Так по данным Ribeiro С. М. и др. под воздействие табачного дыма происходит расширение ЭПС в бокаловидных экзокриноцитах, и подобные структурные изменения являются проявлением стресса ЭПС [103]. Подобные

проявления стресса ЭПС подтверждаются и нашими данными электронно-микроскопического исследования (рис. 27, 28). Можно предположить, что постоянно курящие пациенты, у которых развивается ХОБЛ, имеют определенные дефекты системы «ответа на мисфолдинг» (UPR) и Nrf2 – сигнального пути, что требует дальнейшего исследования.

Несмотря на достаточно универсальные механизмы развития митохондриальной дисфункции и стресса ЭПС, возможно, именно эти звенья патогенетического процесса могут быть базовыми и пусковыми в развитии ХОБЛ. И наоборот, эффективная реакция системы «ответа на мисфолдинг» и достаточные компенсаторные возможности митохондриального и белок-синтетического аппаратов клетки, возможно, лежат в основе резистентности к развитию ХОБЛ даже при длительном воздействии табачного дыма.

У курящих лиц без ХОБЛ это предположение подтверждается данными ультраструктурных исследований бокаловидных экзокриноцитов СОБ, которые были увеличены в объеме, а в цитоплазме определялись плотноупакованные электронно-прозрачные везикулы слизистого секрета, нередко с признаками экструзии, что сочеталось с одновременным увеличением в цитоплазме этих клеток объемной плотности ЭПС и митохондрий, а также результатами морфометрии (таб. 17). При этом, посредством корреляционного анализа были выявлены прямые взаимосвязи между удельным объемом ЭПС и митохондрий как в бокаловидных, так и в базальных эпителиоцитах (рис. 44). Учитывая, что у данной группы курильщиков ХОБЛ не развилась даже при длительном воздействии табачного дыма, данный факт свидетельствует о том, что расширение ЭПС происходит в рамках именно адаптивной реакции на повышенную белоксинтезирующую нагрузку с сохранением нормальной функции энергетического аппарата клетки при отсутствии необратимых структурных изменений организации митохондрий и развития стойкой митохондриальной дисфункции. Вероятно, именно данные механизмы лежат в основе резистентности к развитию ХОБЛ у части популяции на фоне воздействия табачного дыма. Кроме того, выявленная обратная корреляция между УО ЭПС в бокаловидных

эпителиоцитах и плотностью макрофагов собственной пластинки СОБ свидетельствует о прямой роли макрофагов в формировании адаптивной реакции к табачному дыму (рис. 45)

В тоже время, у курильщиков с ХОБЛ по сравнению с группой «здоровых» курильщиков в эпителиальных клетках СОБ нами обнаруживались морфологические маркеры, отражающие истощение белок-синтетического и энергетического аппаратов клеток, что предположительно может влиять на функциональную активность шаперонов ЭПС, и в свою очередь усиливать стресс ЭПС и приводить к срыву UPR, расширению и необратимой перегрузке эндоплазматической сети с последующей гибелью клетки. Данные морфофункциональные изменения подтверждаются результатами корреляционного анализа: в отличие от группы сравнения у курильщиков с ХОБЛ были выявлены обратные взаимосвязи между удельным объемом ЭПС и митохондрий в бокаловидных и в базальных эпителиоцитах (рис. 47)

Кроме того, морфологические признаки регенераторно-пластического и энергетического дефицита, срыва процесса UPR были подтверждены данными дискриминантного анализа (УО митохондрий и ЭПС в бокаловидных и базальных эпителиоцитах) (таб. 19, 20), а также была показана связь данных изменений с клинико-функциональными тестами и снижением спирометрических показателей (обратная корреляция между ОФВ1/ФЖЕЛ и УО ЭПС в бокаловидных эпителиоцитах) (рис. 47).

После выявления основных признаков формирования заболевания ХОБЛ среди биохимических, иммунологических, морфологических показателей был проведен сравнительный внутригрупповой анализ с целью поиска факторов, способствующих прогрессированию заболевания (табл. 25). По результатам данного анализа можно предположить, что удельный объем покровного эпителия, базальных эпителиоцитов, а также удельный объем ЭПС в базальных и бокаловидных эпителиоцитах – являются маркерами, которые отражают не только процессы эпителиального ремоделирования, но и являются ключевыми маркерами неуклонного снижения легочной функции и прогрессирования

заболевания ХОБЛ. Кроме того, результаты внутригруппового анализа еще раз подтверждают значимую роль изменений со стороны ЭПС под воздействием табачного дыма, в том числе нарушения функционирования сложного гомеостатического механизма, известного как «ответ на мисфолдинг» (unfolded protein response, UPR), не только при развитии ХОБЛ, но и при прогрессировании заболевания.

В целом можно отметить, что процесс дезинтеграции эпителиального пласта, наблюдаемый нами у курящих пациентов с ХОБЛ, отражается в альтерации ядра, дисфункции белок-синтетического и истощении энергетического аппаратов в реснитчатых и базальных эпителиоцитах и, соответственно, в снижении УО митохондрий и увеличении УО ЭПС, как признаков развития митохондриальной дисфункции и перегрузки ЭПС в рамках нарушения механизма «ответ на мисфолдинг» (unfolded protein response, UPR). Этот феномен отражается в данных корреляционного и дискриминантного анализов, согласно которым УО митохондрий и ЭПС в бокаловидных и базальных эпителиоцитах играют ведущую роль в процессе ремоделирования бронхов при ХОБЛ у курильщиков. Согласно данным Непомнящих Г. М. [2,3] похожие процессы в клетках эпителия бронхов сопровождаются регенераторно-пластической недостаточностью, сущность которой заключается в несостоятельности пластического обеспечения функций и снижении процессов регенерации.

При проведении корреляционного анализа в группе курильщиков без ХОБЛ были выявлены разнонаправленные взаимосвязи различных цитологических, морфологических и иммунологических маркеров, в том числе с интенсивностью и продолжительностью курения, что свидетельствует о многогранности реакции бронхиального дерева на воздействие табачного дыма. А с учетом отсутствия у курильщиков этой группы необратимой бронхиальной обструкции и других клинико-диагностических критериев ХОБЛ, можно сделать вывод об адаптивном характере данной реакции и наличии репаративных и энергетических резервов

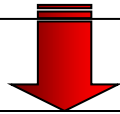


бронхиального дерева для сохранения «резистентности» к воздействию табачного дыма.

Таким образом, обнаруженные нами тканевые, клеточные и молекулярные взаимодействия в бронхиальной стенке у курящих пациентов без признаков ХОБЛ носят адаптивно-приспособительный характер, направленный на усиление белок-синтетических и энергетических процессов в эпителиальных клетках, а также снижении функциональной активности клеток воспалительного инфильтрата. У курящих пациентов с ХОБЛ в бронхиальной стенке обнаружены признаки ремоделирования, которые реализуются в структурных перестройках клеток эпителия бронхов, изменении функционирования клеток стромы, морфологических признаках нарушения гемодинамики, что сопровождается формированием эпителиально-стромальной и эндотелиальной дисфункции, а также ультраструктурными признаками дезадаптивных нарушений белок-синтезирующего и энергетического аппаратов клетки. При этом была показана достоверная связь ряда ключевых биохимических, иммунологических, морфологических маркеров развития заболевания с клиническими критериями постановки диагноза ХОБЛ. Полученные в ходе исследования результаты в полном объеме отражены в концепции работы.

## КОНЦЕПЦИЯ РАБОТЫ

### ДЛИТЕЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ТАБАЧНОГО ДЫМА



Курильщики без ХОБЛ

Компенсаторная реакция слизистой оболочки бронхов в виде:

Расширение просвета сосудов микроциркуляторного русла СОБ, сопровождающееся:

- увеличением удельного объема капилляров;
- увеличением удельного объема микропиноцитозных везикул и цитоплазматических выростов в эндотелиоцитах капилляров;
- увеличение размера секреторных гранул Вейбеля – Палади в эндотелиоцитах капилляров

высокая активность  $\alpha 1$ -ПИ в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте

- увеличение количества макрофагов в СОБ, в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте

однонаправленное повышение концентрации в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте как провоспалительных (ИЛ-8, TNF- $\alpha$ , интерферона-гамма), так и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10)

-гипертрофия и гиперплазия бокаловидных клеток;

- увеличение удельного объема митохондрий в бокаловидных экзокриноцитах;
- увеличение удельного объема желез в подслизистой оболочке бронхов;

снижение общего количества эпителиоцитов в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте



АДАПТИВНАЯ РЕАКЦИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ БРОНХОВ НА

Функция внешнего дыхания в норме, ОФВ1/ФЖЕЛ > 70%, ОФВ1 > 85%, нет клинических проявлений ХОБЛ

**ДЛИТЕЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ТАБАЧНОГО ДЫМА****Курильщики с ХОБЛ****Реакция слизистой оболочки бронхов****Ремоделирование сосудов микроциркуляторного русла**

1. Уменьшение удельного объема капилляров
2. Эндотелиальная дисфункция
3. Уменьшение удельного объема микропиноцитозных везикул в эндотелиоцитах капилляров бронхов
4. Уменьшение размера секреторных гранул Вейбеля – Палади в эндотелиоцитах капилляров бронхов

**Нарушение гемодинамики и повышение плотности клеточного инфильтрата собственной пластинки СОБ**

1. Повышение плотности в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, дегранулированных тучных клеток
2. Повышение в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте провоспалительных (ИЛ-8, TNF- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ ) и снижение противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10)
3. Высокая активность эластазы на фоне дефицита активности  $\alpha_1$ -ПИ в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте

**Фиброз собственной пластинки СОБ**

1. Увеличение удельного объема соединительной ткани в собственной пластинке СОБ
2. Увеличение количества фибробластов на 1 мм<sup>2</sup> бронхобиоптата
3. Увеличение концентрации TGF- $\beta$ 1 в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте

**Эпителиальное ремоделирование**

1. Увеличение удельного объема покровного эпителия бронхов
2. Увеличения удельного объема базальных эпителиоцитов бронхов
3. Увеличение удельного объема эндоплазматической сети в эпителиоцитах СОБ
4. Уменьшение удельного объема митохондрий в эпителиоцитах СОБ

**Снижение функции внешнего дыхания, ОФВ1/ФЖЕЛ < 70%,  
клиническая картина ХОБЛ****ДЕЗАДАПТИВНАЯ РЕАКЦИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ БРОНХОВ**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящей работы было выявление тканевых, клеточных и молекулярных маркеров резистентности к развитию ХОБЛ при длительном воздействии табачного дыма в бронхиальных секретах, полученных путем индуцированного мокротоотделения, бронхиальных смывах, а также в слизистой оболочке бронхов на цитологическом, морфологическом, биохимическом и иммунологическом уровнях.

На основании исследования были выявлены признаки, которые отражают основные механизмы ремоделирования бронхиальной стенки и формирования ХОБЛ при хроническом воздействии табачного дыма. К ним относятся: повышение высоты покровного эпителия в бронхиальной стенке, преимущественно, за счет базальных клеток, увеличение удельного объема эндоплазматической сети в бокаловидных и базальных эпителиоцитах, с одновременным снижением удельного объема и изменением структуры митохондрий в них; ультраструктурные признаки капилляро-трофической недостаточности со снижением микропиноцитозных везикул и размера секреторных гранул Вейбеля-Палади в эндотелиальных клетках СОБ, что сочеталось с более высокой концентрацией TNF- $\alpha$ , ИЛ-8, ИЛ-10, ИНФ- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 в бронхиальном содержимом и ассоциировано с дисбалансом в протеиназ-антипротеиназной системе и увеличением общего числа бронхиальных эпителиоцитов с признаками дистрофии.

Согласно нашим данным эффективная тканевая и клеточная реакция организма в «ответ на мисфолдинг» и достаточные компенсаторные возможности митохондриального и белок-синтетического аппаратов клетки, возможно, лежат в основе резистентности к развитию ХОБЛ даже при длительном воздействии табачного дыма.

По результатам дискриминантного анализа вышеперечисленные маркеры являются предикторами развития заболевания, что также подтверждается множественными корреляциями между ними, клинико-функциональными тестами и данными анамнеза, такими как интенсивность курения (индекс пачка-

лет), стаж хронического бронхита, длительность синдрома одышки, отношение ОФВ1/ФЖЕЛ и ОФВ1 (после бронходилататора). Полученные результаты исследования могут быть взяты за основу разработки критериев ранней диагностики ХОБЛ до появления фиксированной бронхообструкции по результатам клинического и инструментального обследования пациента. В частности цитологический, биохимический и иммунологический анализ ИМ можно рассматривать как неинвазивный скрининговый метод ранней диагностики или выявления высокой предрасположенности к развитию заболевания.

Данные, полученные в ходе исследования, могут стать направляющим вектором для более углубленного поиска факторов резистентности к развитию ХОБЛ под воздействием табачного дыма, а также новых мишеней для эффективной патогенетической базисной терапии.

## ВЫВОДЫ

1. У курильщиков без ХОБЛ сохранялось типичное строение слизистой оболочки бронхов при минимальных воспалительных и дистрофических изменениях в реснитчатых эпителиоцитах на фоне гиперплазии бокаловидных клеток и белково-слизистых желез бронхов. У курильщиков с ХОБЛ регистрировались признаки как сосудистого, так и эпителиального ремоделирования, приводящие к нарушению гемодинамики, фиброзу собственной пластинки СОБ, атрофии и плоскоклеточной метаплазии эпителиальной выстилки бронхов.

2. При электронно-микроскопическом исследовании бронхобиоптатов у курильщиков без ХОБЛ определялись ультраструктурные признаки активации пластического и энергетического аппаратов в базальных и бокаловидных эпителиоцитах, усиление секреторных процессов в бокаловидных клетках, стимуляция транскапиллярного транспорта в собственной пластинке СОБ. У курильщиков с ХОБЛ в бронхиальной стенке обнаруживались морфологические признаки эндотелиальной дисфункции, снижение транскапиллярного обмена, ассоциированные с истощением структурно-метаболических резервов и регенераторно-пластической недостаточностью бронхиальных клеток.

3. У курильщиков без ХОБЛ обнаружена адаптивная реакция структур бронхиальной стенки, сопровождающаяся незначительным повышением в бронхиальном секрете общего количества нейтрофилов с сохранением нормального числа макрофагов, более высокой ферментативной активностью  $\alpha 1$ -ПИ. У курильщиков с ХОБЛ на фоне выраженного нейтрофильного воспаления с уменьшением общего числа макрофагов и появлением большего количества бронхиальных эпителиоцитов с признаками дистрофии регистрировалось повышение в бронхиальной слизи ИЛ-8 в 120 раз, TNF- $\alpha$  в 5 раз, TGF- $\beta 1$  в 7 раз, сочетающееся с дисбалансом в системе протеаз-антипротеаз.

4. Ведущими тканевыми, клеточными и молекулярными маркерами резистентности у курильщиков к развитию ХОБЛ являются: сохранение нормальной объемной плотности покровного эпителия; повышение количества

макрофагов при отсутствии значительного увеличения числа нейтрофилов, концентрации TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ 1 в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте; сохранение нормального удельного объема эндоплазматической сети и митохондрий в эпителиальных клетках слизистой оболочки бронхов на фоне увеличения удельного объема микропиноцитозных везикул в эндотелиоцитах капилляров бронхиальной стенки.

### Практические рекомендации

1. Цитологическое, биохимическое и иммунологическое исследование индуцированной мокроты можно рекомендовать как скрининговый неинвазивный тест для создания групп высокого риска развития ХОБЛ.

2. Определение количества макрофагов, нейтрофилов, бронхиального эпителия обычного строения, активности эластазы и  $\alpha_1$ -ПИ, а также TGF- $\beta_1$ , ИЛ-8, TNF- $\alpha$  в бронхиальных смывах можно использовать как ведущие маркеры для прицельной ранней диагностики ХОБЛ.

3. При прогнозировании высокого риска развития ХОБЛ у курильщиков с нормальной функцией внешнего дыхания целесообразно проводить бронхобиопсию с морфологическим анализом гистологического материала.



### Список литературы

1. Чучалин, А.Г. Глобальная стратегия лечения, диагностики и профилактики хронической обструктивной болезни легких / под ред. А.Г. Чучалина – М., 2006. – 96 с.
2. Непомнящих, Г.И. Биопсия бронхов: морфогенез общепатологических процессов в легких / Г.И. Непомнящих. – М.: Изд-во РАМН, 2005.– 405 с.
3. Непомнящих Г.И. Морфогенез и прижизненная патоморфологическая диагностика хронических патологических процессов в легких / Г.И. Непомнящих, Л.М. Непомнящих // Пульмонология. – 1997. – № 2. – С. 7–16.
4. Полосухин, В.В. Диагностический бронхоальвеолярный лаваж / В.В. Полосухин, С.М. Егунова, С.Г. Чувакин. – Новосибирск: Наука, 1995. – 163 с.
5. Фисенко, В. Бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких: особенности различий и сходства / В.Фисенко, Н. Чичкова // Врач. – 2008. – № 5. – С. 6–10.
6. Авдеев, С.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких как системное заболевание / С.Н.Авдеев // Пульмонология. – 2007. – № 2. – С. 104–112.
7. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
8. Barnes, P.J. Chronic Obstructive Pulmonary Disease / P.J. Barnes // The New England Journal of Medicine. – 2000. – Vol. 343. – P. 269–280.
9. Decramer, M. Asthma and COPD: differences and similarities / M. Decramer, O. Selroos // Int. J. Clin. Pract.–2005.–Vol.59, N4.– P. 385–398.
10. Barnes, P.J. Chronic obstructive pulmonary disease: a growing but neglected global epidemic / P.J. Barnes // PLoS Med. – 2007. – Vol. 4, N 5. – P. 779–780.
11. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2011 г.) / Пер. с англ. под ред. А.С. Белевского. — М.: Российское респираторное общество, 2012. — 80 с.

12. Овчаренко, С.И. Современные проблемы диагностики хронической обструктивной болезни легких / С.И. Овчаренко, И.В. Лещенко // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т. 11, № 4. – С. 76–81.
13. Стародубов, В.И. Анализ основных тенденций изменения заболеваемости населения хроническими обструктивными болезнями легких и бронхоэктатической болезнью в Российской Федерации в 2005-2012 годах / В.И. Стародубов, С.А. Леонов, Д.Ш. Вайсман // Медицина. – 2013. – N. 4. – P. 1 – 31.
14. Roth, M. Fundamentals of chronic inflammatory lung diseases (asthma, COPD, fibrosis)/ M. Roth //Ther Umsch. - 2014 May.- Vol. 71, N 5.- P.- 258-61.
15. Tam, A. Why are women more vulnerable to chronic obstructive pulmonary disease?./ A. Tam, DD. Sin // Expert Rev Respir Med. - 2013 Jun. – Vol. 7, N 3.- P.-197-9.
16. Rycroft, C.E. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: a literature review/ C.E. Rycroft, A. Heyes, L. Lanza, K. // Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. – 2012. - N7. – P. - 457-94.
17. Чучалин, А.Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких / А.Г. Чучалин, З.Р. Айсанов, С.Н. Авдеев, С.И. Овчаренко, Е.И. Шмелев // Русский медицинский журнал – 2014. – № 5. – С. 331.
18. Аверьянов, А.В. Фенотипы больных хронической обструктивной болезнью легких / А.В. Аверьянов [и др.] // Терапевтический архив. –2009. –№3. – С. 9–15.
19. Цветкова, О.А. Хроническая обструктивная болезнь легких у женщин / О.А. Цветкова, М.Х. Мустафина // Пульмонология. – 2010. – № 1. – С. 113–118.
20. Hill, A.T. Airways inflammation in chronic bronchitis: the effects of smoking and  $\alpha$ 1antitrypsin deficiency / A.T. Hill [et al.] // Eur. Resp. J. – 2000. – Vol. 15. – P. 886–890.

21. Hudy, M.H. Cigarette smoke modulates rhinovirus-induced airway epithelial cell chemokine production / M.H. Hudy [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2010. – Vol. 35. – P. 1256–1263.
22. Thaikootathil, J.V. Cigarette smoke extract reduces VEGF in primary human airway epithelial cells / J.V. Thaikootathil [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2009. – Vol. 33, N 11. – P. 835–843.
23. Zhou, Y. COPD in Chinese nonsmokers / Y. Zhou [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2009. – Vol. 33, N 11. – P. 509–518.
24. Barnes, P.J. Macrophages as orchestrators of COPD / P.J. Barnes // *COPD.* – 2004. – Vol. 1, N 1. – P. 56–70.
25. Barnes, P.J. New molecular targets for the treatment of neutrophilic disease / P.J. Barnes // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 160. – P. 1532–1539
26. Shapiro, S.D. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease / S.D. Shapiro // *Biochem. Soc. Trans.* – 2002. – Vol. 30. – P. 98–102.
27. Friedrichs, B. Cigarette-smoke-induced priming of neutrophils from smokers and non-smokers for increased oxidative burst response is mediated by TNF- $\alpha$  / B. Friedrichs, U. Neumann, J. Schüller, M.J. Peck // *Toxicol In Vitro.* - 2014 Oct. - Vol. 28, N 7. – P. 1249-58
28. Metcalfe, H.J. Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages / H.J. Metcalfe, S. Lea, D. Hughes, R. Khalaf, K. Abbott-Banner, D. Singh // *Clin Exp Immunol.* - 2014 Jun. - 176(3). – P. - 461-72.
29. Murugan, V. Signal transduction pathways linking the activation of alveolar macrophages with the recruitment of neutrophils to lungs in chronic obstructive pulmonary disease / V. Murugan, M.J. Peck // *Exp Lung Res.* - 2009 Aug. - 35(6). – P. - 439-85.
30. Lockett, A.D.  $\alpha_1$ -Antitrypsin modulates lung endothelial cell inflammatory responses to TNF- $\alpha$ . / A.D. Lockett, S. Kimani, G. Ddungu, S. Wrenger, R.M. Tuder., S.M. Janciauskiene, I. Petrache // *Am J Respir Cell Mol Biol.* - 2013 Jul. - 49(1): - P. - 143-50.

31. Hacievliyagil, S.S. Airway inflammatory markers in chronic obstructive pulmonary disease patients and healthy smokers / S.S. Hacievliyagil, L.C. Mutlu, I. Temel // Niger J Clin Pract. - 2013 Jan-Mar. - 16(1).- P. - 76-81.
32. Аверьянов, А.В. Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни легких / А.В. Аверьянов// Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 4. – С.3–8.
33. Petropoulou, P. Measurement of both native and inactivated forms of alpha1 proteinase inhibitor in human inflammatory extracellular fluids / P. Petropoulou [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2003.–Vol.30, N9.– P. 795–801.
34. Papi, A. Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / A. Papi [et al.] // Proc. Am. Thorac. Soc. – 2006. – Vol. 3. - N3- P. 245–251.
35. Kunz, L.I. Smoking status and anti-inflammatory macrophages in bronchoalveolar lavage and induced sputum in COPD / L.I. Kunz, T.S. Lapperre, J.B. Snoeck-Stroband, S.E. Budulac, W. Timens [et al.] // Respir Res. – 2011 Mar. – 22 – P. - 12-34.
36. Mulgrew, A.T.  $\alpha$ -antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant / A.T. Mulgrew, C.C. Taggart, M.W. Lawless // Chest. – 2004. – Vol. 125. – P. 1952–1957.
37. Timens, W. Etiology and pathogenesis chronic obstructive pulmonary disease / W. Timens // Update in Pathology 21 ECOF Pathology. – Istanbul, 2007. – P. 294–296.
38. Eltboli, O. COPD exacerbation severity and frequency is associated with impaired macrophage efferocytosis of eosinophils / O. Eltboli, M. Bafadhel, F. Hollins [et al.] // BMC Pulm Med. - 2014 Jul 9. - 14 (1). – P. - 112.
39. D'Armiento, J.M. Eosinophil and T cell markers predict functional decline in COPD patients / J.M. D'Armiento, S.M. Scharf, M.D. Roth [et al.] // Respir Res. - 2009 Nov 19. – N10. – P. - 113

40. Kaur, M. Neutrophil chemotaxis caused by chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages: the role of CXCL8 and the receptors CXCR1/CXCR2 / M. Kaur, D. Singh // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2013 Oct. - 347(1). – P. - 173-80.
41. Tuder, R. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema / R. Tuder [et al.] // *Proc. Am. Thorac. Soc.* – 2006. – Vol. 3. – P. 503–511.
42. Donnelly, L.E. Defective phagocytosis in airways disease / L.E. Donnelly, P.J. Barnes // *Chest.* - 2012 Apr. - 141(4). – P. -1055-62.
43. Barnes, P.J. Chronic Obstructive Pulmonary Disease / P.J. Barnes // *The New England Journal of Medicine.* – 2000. – Vol. 343. – P. 269–280.
44. Papi, A. Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / A. Papi [et al.] // *Proc. Am. Thorac. Soc.* –2006. – Vol.3, N3.– P. 245–251.
45. Taylor, A.E. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD / A.E. Taylor , T.K. Finney-Hayward, J.K. Quint, P.J. Barnes [et al.] // *Eur Respir J.* - 2010 May. - 35(5). – P. - 1039-47
46. Berenson, C.S. Phagocytic dysfunction of human alveolar macrophages and severity of chronic obstructive pulmonary disease / C.S. Berenson, R.L. Kruzel, E. Eberhardt, S. Sethi // *J. Infect Dis.*- 2013 Dec 15. – 208(12). – P. -2036-45.
47. Berenson C.S. Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease / C.S. Berenson, M.A. Garlipp, L.J Grove, J. Maloney, S. Sethi // *J Infect Dis.* - 2006 Nov 15. - 194(10).- P. - 1375-84.
48. Букреева, Е.Б. Экзогенные и эндогенные факторы формирования хронической обструктивной болезни легких / Е.Б. Букреева [и др.] // *Бюллетень Сибирской медицины.* – 2003. – Т.2, №1. – С. 75 – 77.
49. Букреева, Е.Б. Этиология инфекционного процесса и особенности воспаления при хронической обструктивной болезни легких: автореф. дис. .... д-ра мед. наук: 14.01.25 / Е.Б. Букреева. – Томск, 2004. – 42 с.

50. Кругликов, Г.Г. Морфологическая характеристика хронического обструктивного бронхита / Г.Г. Кругликов, Б.Т. Величковский, А.Г. Чучалин // Пульмонология. – 2003. – № 3. – С. 16–19.
51. Puchelle E., Airway epithelial repair regeneration and remodelling after injury in chronic obstructive pulmonary disease / E. Puchelle [et al.] // Proc. Amer. Thor. Soc. – 2006. – Vol. 3. – P. 726–733.
52. CD8<sup>+</sup>T- lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease / M. Saetta, Di A. Stefano, G. Turato [et al.] // Eur. Respir. J. – 2004. – Vol. 157. – P. 822–826.
53. Кириллова, Н.А. Субпопуляции Т-регуляторных клеток при бронхиальной астме и гетерогенных фенотипах хронической обструктивной болезни легких / Н.А. Кириллова, Г.Э. Черногорюк, Е.Э. Кремер [и др.] // Бюллетень Сибирской медицины. – 2011. – № 1. – С. 48–54.
54. Jeffery, P.K. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease / P.K. Jeffery // Proc. Am. Thorac. Soc. – 2004. – Vol. 1. – P. 176–183.
55. Barcelo, B. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking / B. Barcelo [et al.] // Eur. Respir. J. – 2008. – Vol. 31, N 11. – P. 555–562.
56. Аверьянов, А.В. Дефицит  $\alpha_1$  антитрипсина и хроническая обструктивная болезнь легких / А.В. Аверьянов, А.Э. Поливанова // Пульмонология. – 2007. – № 3. – С. 103–109.
57. Fischer, B.M. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation / B.M. Fischer, E. Pavlisko, J.A. Voynow // Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. – 2011.- N6. – P.-413-21.
58. Polivanova, A. Neutrophil elastase in severe COPD and asthma exacerbation / A. Polivanova [et al.] // Eur. Respir. J. – 2006. – Vol.28, Suppl.50. – P. 316–319.

59. Hou, H.H. Elastase induces lung epithelial cell autophagy through placental growth factor: A new insight of emphysema pathogenesis / H.H. Hou, S.L. Cheng [et al.] // *Autophagy*. - 2014 Jun 25. -10 (9).
60. Sandhaus, R.A. Neutrophil elastase-mediated lung disease / R.A. Sandhaus, G. Turino // *COPD*. - 2013 Mar 10 Suppl 1. - P. - 60-3.
61. Hoenderdos, K. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease / K. Hoenderdos, A. Condliffe // *Am J Respir Cell Mol Biol*. - 2013 May; 48(5). – P. - 531-9.
62. Demkow, U. Role of elastases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: implications for treatment / U. Demkow, F.J. van Overveld // *Eur J Med Res*. - 2010 Nov 4; 15 Suppl 2. – P. - 27-35.
63. Hubbard, R.C. Neutrophil accumulation in the lung in  $\alpha$ -antitrypsin deficiency Spontaneous release of leukotriene B4 by alveolar macrophages / R.C. Hubbard [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 88. – P. 891–897.
64. Gresnigt, M.S. Neutrophil-mediated inhibition of proinflammatory cytokine responses./ M.S. Gresnigt, L.A. Joosten [et al.] // *J Immunol.* - 2012 Nov 15. - 189(10). – P. - 4806-15.
65. Kohri, K. Neutrophil elastase induces mucin production by ligand\_dependent epidermal growth factor receptor activation / K. Kohri, I.F. Ueki, J.A. Nadel // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167, N 6. – P. 5948–5954.
66. Polanska, B. Neutrophil elastase and interleukin-8 as inflammatory mediators in mechanically ventilated children / B. Polanska [et al.] // *Med. Sci. Monit.* – 2004. – Vol. 10. – P. 463–468.
67. Yamanouchi, H. Neutrophil elastase: alpha-1-proteinase inhibitor complex in serum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary fibrosis / H. Yamanouchi [et al.] // *Eur. Respir. J.* –2008. – Vol. 11. – P. 120–125.
68. Макинский, А.И. Эластаза нейтрофилов в сыворотке крови и активность ее ингибиторов у больных туберкулезом легких/ А.И. Макинский, В.Л. Доценко, А.Я. Спирина // *Проблемы туберкулеза*. – 2005. – № 4. – С. 36–39.

69. Arai, N. Inhibition of neutrophil elastase-induced goblet cell metaplasia by tiotropium in mice / N. Arai [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2010. – Vol.35.– P. 1164–1171.
70. Sallenave, J.M. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease / J.M. Sallenave [et al.] // *Eur. Respir. J.*– 2000. – Vol. 1. – P. 87–92.
71. Сагиндикова, Г.Е. Роль матриксных металлопротеиназ в патогенезе и морфогенезе фиброзно-кавернозного туберкулеза легких у лиц, длительное время проживавших в Семипалатинской области Казахстана/ Г.Е. Сагиндикова [и др.] // *Архив патологии.* – 2007. – №3. – P. 28–32.
72. Fink, K. The role of metalloproteinases in modification of extracellular matrix in invasive tumor growth, metastasis and angiogenesis / K. Fink, J. Boratyński // *Postepy Hig Med Dosw (Online).* - 2012 Sep 10; 66. - P.-609-28.
73. Arroyo, A.G. Matrix metalloproteinases: new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease / A.G. Arroyo, L. Genís [et al.]// *Curr Pharm Des.* - 2007; 13 (17). – P. - 1787-802.
74. Фисенко, В. Сосудистый компонент ремоделирования при бронхиальной астме и эффекты лекарственных средств / В. Фисенко // *Врач.* – 2007. – № 1. – С. 17–18.
75. Аверьянов, А.В. Нейтрофильная эластаза и болезни органов дыхания / А.В. Аверьянов, А.Э. Поливанова // *Пульмонология.* – 2006. – № 5.– С. 74–79.
76. Gernez, Y. Chanez Neutrophils in chronic inflammatory airway diseases: can we target them and how? / Y. Gernez, R. Tirouvanziam, P. Chanez // *Eur. Respir. J.* – 2010. – Vol. 35. – P. 467–469.
77. Brand, P. Lung deposition of inhaled  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor in cystic fibrosis and  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency / P. Brand [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2009. – Vol. 34, N 2. – P. 354–360.
78. Stockley, RA. Alpha1-antitrypsin review / R.A. Stockley // *Clin Chest Med.* - 2014 Mar. - 35 (1). - P. - 39-50.



79. Taggart, C. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in 1<sub>1</sub>-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity / C. Taggart, D. Cervantes Laurean, G. Kim // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, N 35. – P. 265–272.

80. Sallenave, J.M. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elastase specific inhibitor in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes / J.M. Sallenave [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2004. – Vol. 11. – P. 733–741.

81. McCarthy, C. The role and importance of glycosylation of acute phase proteins with focus on alpha-1 antitrypsin in acute and chronic inflammatory conditions / C. McCarthy, R. Saldova [et al.] // J Proteome Res. - 2014 Jul 3. - 13 (7). – P. - 3131-43.

82. Thaikootathil, J.V. Cigarette smoke extract reduces VEGF in primary human airway epithelial cells / J.V. Thaikootathil [et al.] // Eur. Respir. J. – 2009. – Vol. 33, N 11. – P. 835–843.

83. Rutgers, S.R. Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage in COPD / S.R. Rutgers [et al.] // Eur. Respir. J. – 2000. – Vol. 10, N 15. – P. 109–115.

84. Непомнящих, Д.Л. Биопсия в гастроэнтерологии / Д.Л. Непомнящих [и др.]. – М.: Изд-во РАМН, 2010. – 368 с.

85. Непомнящих, Д.Л. Ультроструктурные изменения эпителия при бронхиальной астме, ассоциированной с гастроэзофагиальным рефлюксом / Д.Л. Непомнящих [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – № 8. – С. 221–226.

86. Непомнящих, Г.И. Хронические воспалительные процессы в легких: прижизненная патолого-анатомическая диагностика и прогноз / Г.И. Непомнящих, А.В. Кононов, Л.М. Непомнящих // Архив патологии. – 1990. – № 2. – С. 16–20.

87. Нартикова, В.Ф. Унифицированный метод определения активности  $\alpha$ 1-антитрипсина и  $\alpha$ 2-макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека /

В.Ф. Нартикова // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Т. 25, № 4. – С. 494–499.

88. Failla, M. Exhaled bronchial cysteinyl leukotrienes in allergic patients / M. Failla, N. Crimi, C. Vancheri // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 25–31.

89. Авдеев, С. Н. Противовоспалительная терапия хронической обструктивной болезни лёгких: настоящее и будущее/ С.Н. Авдеев // *Медицинский совет.* – 2013. - №3. – С. 8 – 15.

90. Черняев, А.Л. Воспаление при хронической обструктивной болезни легких: молекулярные основы патогенеза / А.Л. Черняев, М.В. Самсонова // *CONSILIUM MEDICUM UKRAINA.*- 2011. - №1.

91. Comandini, A. Markers of anti-oxidant response in tobacco smoke exposed subjects: a data-mining review / A. Comandini, V. Marzano, G. Curradi [et al.] // *Pulm Pharmacol Ther.* - 2010 Dec 23(6). – P. - 482-92.

92. Cantin, A.M. Cigarette smoke-induced proteostasis imbalance in obstructive lung diseases / A.M. Cantin, M.V. Richter // *Curr Mol Med.* - 2012 Jun

93. Cantin, A.M. Cellular response to cigarette smoke and oxidants: adapting to survive / A.M. Cantin // *Proc Am Thorac Soc.* - 2010 Nov. -7(6). – P. -368-75.

94. Kelsen, S.G. Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach / S.G. Kelsen, X. Duan, R. Ji, O. Perez [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol.* - 2008 May. - 38(5). – P. - 541-50.

95. Di Stefano, A. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview / A. Di Stefano, G. Caramori, F.L. Ricciardolo [et al.] // *Clin Exp Allergy.* - 2004 Aug; 34(8). – P. - 1156-67.

96. Zhang, X. Increased interleukin (IL)-8 and decreased IL-17 production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) provoked by cigarette smoke / X. Zhang, H. Zheng, H. Zhang [et al.] // *Cytokine.* - 2011 Dec. - 56 (3). – P. -717-25.

97. Geraghty, P. Induction of the unfolded protein response by cigarette smoke is primarily an activating transcription factor 4-C/EBP homologous protein mediated

process / P. Geraghty, A. Wallace, J.M. D'Armiento // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* - 2011; 6. - P. -309-19.

98. Tagawa, Y. Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP) / Y. Tagawa, H. Hiramatsu, A. Kasai [et al.] // *Free Radic Biol Med.* - 2008 Jul 1; 45(1). – P. - 50 - 59.

99. Malhotra, D. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1 / D. Malhotra, R. Thimmulappa, A. Navas-Acien [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2008 Sep 15; 178 (6). – P. - 592-604.

100. Min, T. Critical role of proteostasis-imbalance in pathogenesis of COPD and severe emphysema / T. Min, M. Bodas, S. Mazur, N. Vij // *J Mol Med (Berl).* 2011 Jun; 89(6). – P. - 577-93.

101. Blumental-Perry, A. Unfolded Protein Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Smoking, Aging and Disease; a SAD trifecta / A. Blumental-Perry // *Curr Mol Med.* - 2012 Jun 5.

102. Zhao, H. Measuring the impact of cigarette smoke on the UPR./ H. Zhao, J. Yang, L. Shan, E.D. Jorgensen // *Methods Enzymol.* - 2011. – 489/ -P. - 147-64.

103. Ribeiro, C.M. Endoplasmic Reticulum Stress in Chronic Obstructive Lung Diseases / C.M Ribeiro, W.K. O'Neal // *Curr Mol Med.* - 2012 Jun 5.

104. Starrett, W. Sulforaphane inhibits de novo synthesis of IL-8 and MCP-1 in human epithelial cells generated by cigarette smoke extract / W. Starrett, D.J. Blake // *J Immunotoxicol.* - 2011 Jun; 8(2). - P. - 150-8.

105. Tatsumi, K. Effects of smoking on the pathogenesis of COPD / K. Tatsumi // *Nihon Rinsho.* - 2007 Apr; 65(4). – P.- 605-10.

106. Stockley, R.A. Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease / R.A. Stockley, D. Mannino, P.J. Barnes // *Proc Am Thorac Soc.* - 2009 Sep 15. - 6(6). – P. - 524-6.

107. Damiá Ade, D. A study of the effect of proinflammatory cytokines on the epithelial cells of smokers, with or without COPD / D. Damiá Ade, J.C. Gimeno, M.J. Ferrer [et al.] // Arch Bronconeumol. - 2011 Sep. - 47(9). - P. - 447-53.
108. Andrew, J. Thorley. Pulmonary epithelium, cigarette smoke, and chronic obstructive pulmonary disease / J. Andrew, Tetley D. Thorley and Teresa Tetley // Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. - Dec 2007. - 2(4). – P. - 409–428.
109. Дедов, И.И. Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека / И.И. Дедов, О.М. Смирнова, А.С. Горелышев // Проблемы эндокринологии. -2012. - №5.- С. – 57-65
110. Черногорюк, Г. Э. Активация антипротеиназ в бронхиальном регионе – фактор толерантности формирования хронической обструктивной болезни лёгких у здоровых злостных курильщиков/ Г. Э. Черногорюк и др. // Биллетень СО РАМН. – 2010. - Том 30, № 3. – С. – 124 – 129
111. Isajevs, S. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD / S. Isajevs [et al.] // Eur. Respir. J. – 2009. – Vol. 33, N 11. – P. 61–67.
112. Черногорюк, Г. Э. Факторы устойчивости части «злостных» курильщиков к развитию хронической обструктивной болезни лёгких/ Г.Э. Черногорюк, А.А. Михайлова, М.С. Санжаровская [и др.] // «Современные проблемы науки и образования». – 2013 №1.
113. Оглоблина, О.Г. Измерение активности трипсино- и эластазоподобных протеиназ полиморфно-ядерных лейкоцитов и уровня их кислотостабильных ингибиторов в бронхиальном секрете человека / О.Г. Оглоблина [и др.]. – М.: МГУ, 1984. – 140 с.
114. Van Pottelberge, G.R. The role of dendritic cells in the pathogenesis of COPD: liaison officers in the front line / G.R.Van Pottelberge, K.R. Bracke, G.F. Joos, G.G. Brusselle // COPD. - 2009 Aug; 6(4). – P.- 284-90.
115. Boucherat, O. Cellular and molecular mechanisms of goblet cell metaplasia in the respiratory airways / O. Boucherat, J. Boczkowski, L. Jeannotte, C. Delacourt // Exp Lung Res. - 2013 May-Jun; 39(4-5). - P. -207-16.

116. Bolton, S.J. Characterisation of the proximal airway squamous metaplasia induced by chronic tobacco smoke exposure in spontaneously hypertensive rats / S.J Bolton [et al.] // *Respir Res.* 2009 Nov 24. - 10:118. doi: 10.1186/1465-9921-10-118.
117. Park, J.A. Human neutrophil elastase-mediated goblet cell metaplasia is attenuated in TACE-deficient mice / J.A Park, A.S. Sharif, T. Shiomi [et al.] // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* - 2013 May 15; 304(10). – P. - 701-7.
118. Shaykhiev, R. EGF shifts human airway basal cell fate toward a smoking-associated airway epithelial phenotype / R. Shaykhiev, W.I. Zuo, I. Chao [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jul 16; 110(29). – P. - 12102-7.
119. Herfs, M. Proinflammatory cytokines induce bronchial hyperplasia and squamous metaplasia in smokers: implications for chronic obstructive pulmonary disease therapy / M. Herfs, P. Hubert, A.L. Poirrier [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Jul; 47(1). – P. -67-79.
120. Hoffmann, R.F. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells / R.F. Hoffmann, S. Zarrintan [et al.] // *Respir Res.* - 2013 Oct 2. – P. - 14 - 97.
121. Hara, H. Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence/ H. Hara, J. Araya, S. Ito [et al.] // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013 Nov 15;305 (10). – P. - 737-46.
122. Aravamudan, B. Mitochondria in lung diseases/ B. Aravamudan, M.A. Thompson , C.M. Pabelick, Y.S. Prakash // *Expert Rev Respir Med.* - 2013 Dec; 7(6). – P. – 631 - 46.
123. Soultzis, N. Downregulation of lung mitochondrial prohibitin in COPD / N. Soultzis, E. Neofytou, M. Psarrou [et al.] // *Respir Med.* 2012 Jul; 106(7). – P. - 954-61.
124. Van der Toorn, M. Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis / M. Van der Toorn, D.J. Slebos, H.G. de Bruin [et al.]// *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* - 2007 May; 292(5). - L1211-8.

125. Визель, А. А. GOLD – 15 лет существования глобальной инициативы / А.А. Визель, И.Ю. Визель, Е.А. Бакунина // Медицинский совет. - 2013 №1. – С.- 20-25.
126. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease [Electronic resource] // Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. - Report 2017. - URL: [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com)
127. Thérèse S, Lapperre. Smoking cessation and bronchial epithelial remodelling in COPD: a cross-sectional study/ Thérèse S Lapperre, Jacob K Sont. [et al.] // Respiratory Research. – 2007.
128. Rutgers, S.R. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke./ S.R. Rutgers, D.S. Postma, H.F. Kauffman [et al.] //Thorax.- 2000 №55.- P. - 12–18
129. Röpcke, S. Repeatability of and relationship between potential COPD biomarkers in bronchoalveolar lavage, bronchial biopsies, serum, and induced sputum/ S. Röpcke, O. Holz [et al.] // PLoS One. – 2012, №7(10).
130. Babusyte, A. Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD / A. Babusyte, K. Stravinskaite [et al.] // Respir Res. - 2007 Nov № 14. - P.- 8-81.
131. Grashoff, W.F. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages / W.F. Grashoff, J.K. Sont, P.J Sterk [et al.] //Am J Pathol. - 1997 Dec;151(6). – P.- 1785-90.
132. Mortaz, E. Mast cells and COPD / E. Mortaz, G. Folkerts, F. Redegeld // Pulm Pharmacol Ther. - 2011 Aug. 24(4). – P.- 367-72.
133. Givi, M.E. Dendritic cells in pathogenesis of COPD / M.E. Givi, F.A. Redegeld, G. Folkerts, E. Mortaz // Curr Pharm Des. – 2012 №18(16). – P. - 2329-35.
134. Vassallo, R Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study / R. Vassallo, P.R. Walters [et al.] //Respir Res. - 2010 Apr 26. - P. - 11- 45.

135. Tsoumakidou, M Decreased sputum mature dendritic cells in healthy smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease / M. Tsoumakidou, I. Bouloukaki, H. Koutala [et al.] // *Int Arch Allergy Immunol.* - 2009;150(4).- P. - 389-97
136. Eckert, R.E. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein regulation of human neutrophil migration / R.E. Eckert, L.E Neuder, J Park [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol.* - 2010 May;42(5). – P.- 586-94.
137. Crosby, L.M. Epithelial repair mechanisms in the lung / L.M. Crosby, C.M. Waters // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* - 2010 Jun. - 298(6). -. P.- 715-31.
138. Klar, J. Fibroblast growth factor 10 haploinsufficiency causes chronic obstructive pulmonary disease / J. Klar, P. Blomstrand, C. Brunmark [et al.] // *J Med Genet.* - 2011 Oct № 48(10). - P. - 705-9.
139. Brehm, J.M. Identification of FGF7 as a novel susceptibility locus for chronic obstructive pulmonary disease / J.M. Brehm, K. Hagiwara, Y. Tesfaigzi, S. Bruse [et al.] // *Thorax.* - 2011 Dec; 66(12). – P. - 1085-90.
140. Xu, S.C. Association between fibroblast growth factor 7 and the risk of chronic obstructive pulmonary disease / S.C. Xu, J.Y. Kuang [et al.] // *Acta Pharmacol Sin.* - 2012 Aug; 33(8). – P. - 998-1003.
141. Ren, J.T. Relationship between the gene polymorphism in fibroblast growth factor-10 and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease 220 cases / J.T. Ren, K. Feng, P. Wang [et al.] // *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* - 2013 Dec; 36(12). - P.- 935-9.
142. Hackett, T.L. Fibroblast signal transducer and activator of transcription 4 drives cigarette smoke-induced airway fibrosis / T.L. Hackett, F. Shaheen [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol.* - 2014 Dec;51(6).- P.- 830-9.
143. Калушкин, А.Г. Уровень цитокинов в плазме крови у курящих и некурящих пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А.Г. Калушкин, А.Д. Таганович [и др] // *Пульмонология.* – 2013, №6.- С. – 27-32.
144. Di Stefano, A. T-helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients / A. Di

Stefano, G. Caramori, I. Gnemmi [et al.] // Clin Exp Immunol. - 2009, №157. – P.- 316–324.

145. Nakamura, M. Plasma cytokine profiles related to smoking-sensitivity and phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease / M. Nakamura, H. Nakamura, N. Minematsu [et al.] // Biomarkers. - 2014 Aug; 19(5)/ - P. -368-77.

146. Bafadhel, M. Profiling of sputum inflammatory mediators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease / M. Bafadhel, M. McCormick, S. Saha // Respiration. - 2012; 83(1). - P.- 36-44.

147. Meuronen, A. Decreased cytokine and chemokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage in asymptomatic smoking subjects / A. Meuronen, M.L Majuri, H. Alenius // Respiration. - 2008 Jan 30; 75(4). – P. - 450-458.

148. Rincon, M. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases / M. Rincon, C.G. Irvin // Int J Biol Sci. - 2012. - Oct 25; 8 (9). – P. - 1281-90.

149. Grubek-Jaworska, H. IL-6 and IL-13 in Induced Sputum of COPD and Asthma Patients: Correlation with Respiratory Tests / H. Grubek-Jaworska, M. Paplinska [et al.] //Respiration. - 2012; 84(2). – P. - 101–7.

150. Eickmeier, O. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function / O. Eickmeier, M. Huebner, E. Herrmann [et al.] // Cytokine. - 2010; 50. – P. - 152–7.

151. Gaetano, C. Cytokine inhibition in the treatment of COPD / C. Gaetano, Adcock I.M., A. Di Stefano and K.F. Chung // Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. - 2014 Apr №9. – P. - 397–412.

152. Celli, B.R. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease / B.R. Celli [et al.] //Am J Respir Crit Care Med. - 2012 May 15; 185 (10). – P. - 1065-72

153. Agustí, A. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype / A. Agustí, L.D. Edwards, S.I. Rennard [et al.] //PLoS One. - 2012; 7(5).



154. He, J.Q. Associations of IL6 polymorphisms with lung function decline and COPD / J.Q. He, M.G. Foreman, K. Shumansky [et al.] // *Thorax*. - 2009 Aug; 64(8). – P. - 698-704.
155. Yanbaeva, D.G. IL6 and CRP haplotypes are associated with COPD risk and systemic inflammation: a case-control study / D.G. Yanbaeva, M.A. Dentener, M.A. Spruit [et al.] // *BMC Med Genet*. - 2009 Mar 9; №10. – P. - 23.
156. Bafadhel, M. Profiling of sputum inflammatory mediators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease / M. Bafadhel, M. McCormick, S. Saha [et al.] // *Respiration*. - 2012; 83(1). - P. - 36-44
157. Tamimi, A. The effects of cigarette smoke on airway inflammation in asthma and COPD: therapeutic implications / A. Tamimi, D. Serdarevic, N.A. Hanania // *Respir Med*. - 2012 Mar, 106 (3). – P. - 319-28.
158. Zhang, X. Increased interleukin (IL)-8 and decreased IL-17 production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) provoked by cigarette smoke / X. Zhang, H. Zheng [et al.] // *Cytokine*. - 2011 Dec; 56(3). – H. - 717-25.
159. Saha, S. Induced sputum and bronchial mucosal expression of interleukin-13 is not increased in chronic obstructive pulmonary disease / S. Saha, V. Mistry, R. Siva [et al.] // *Allergy*. - 2008 Sep; 63(9). - P.- 1239-43.
160. Doe, C. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD / C. Doe, M. Bafadhel [et al.] // *Chest*. - 2010 Nov; 138(5). - P. - 1140-7.
161. Nakamura, M. Plasma cytokine profiles related to smoking-sensitivity and phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease / M. Nakamura, H. Nakamura [et al.] // *Biomarkers*. - 2014 Aug; 19(5). – P. - 368-77.
162. Novartis. Safety and Efficacy of Multiple Doses of Canakinumab (ACZ885) in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Patients. - February 21, 2014.
163. Farrah, K. Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease: clinical and experimental evidence / K. Farrah, S. Ming, X. Chuang and B.C. David // *Expert Rev Clin Immunol*. - Mar 2012; 8 (3). – P. - 285–292.

164. Kawayama, T. Interleukin-18 in pulmonary inflammatory diseases / T. Kawayama, M. Okamoto [et al.] // *J Interferon Cytokine Res.* - 2012 Oct; 32(10). – P. - 443-9.
165. Damiá, A.D. A study of the effect of proinflammatory cytokines on the epithelial cells of smokers, with or without COPD / A.D. Damiá, J.C. Gimeno [et al.] // *Arch Bronconeumol.* - 2011 Sep; 47(9). - P. - 447-53.
166. Solveig, T. Comparison of inflammatory markers in induced and spontaneous sputum in a cohort of COPD patients / T. Solveig, A. Marianne [et al.] // Published online. - Nov 15, 2014.
167. Di Stefano, A. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. Di Stefano [et al.] // *Eur. Respir. J.* 2004; 24. - P. 78–85.
168. Szabo, S.J. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells / S.J. Szabo [et al.] // *Science.* - 2002; 295. – P. - 338–342.
169. Aaron, S.D. TNF $\alpha$  antagonists for acute exacerbations of COPD: a randomised double-blind controlled trial / S.D. Aaron, K.L. Vandemheen, F. Maltais [et al.] // *Thorax.* - 2013; 68. – P. - 142–148.
170. Dentener, M.A. Effect of infliximab on local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a pilot study / M.A. Dentener, E.C. Creutzberg // *Respiration.* - 2008;76. - 275–282.
171. Tomaki, M. Decreased expression of antioxidant enzymes and increased expression of chemokines in COPD / M. Tomaki, H. Sugiura, A. Koarai [et al.] // *Pulm Pharm Ther.* - 2007; 20. – P - 596–605.
172. Mahler, D.A. Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing interleukin-8 in COPD / D.A. Mahler, S. Huang [et al.] // *Chest.* - 2004; 126. – P. - 926–934.
173. Kirsten, A.M. The safety and tolerability of twice-daily oral doses of AZD5069, a novel CXCR2 antagonist, in patients with moderate-to-severe COPD / A.M. Kirsten, B. Balint, M. Cullberg // *Eur Resp J.* - 2012; 38.

174. Magnussen, H. Safety and efficacy of SCH527123, a novel CXCR2 antagonist, in patients with COPD / H. Magnussen, O. Holz, H. Watz [et al.] // *Eur Resp J.* - 2010; 36 (Suppl).
175. Di Stefano, A. Association of increased CCL5 and CXCL7 chemokine expression with neutrophil activation in severe stable COPD / A. Di Stefano, G. Caramori, I. Gnemmi [et al.] // *Thorax.* - 2009; 64. - P.- 968–975.
176. Allakhverdi, Z. Thymic stromal lymphopoietin as a mediator of crosstalk between bronchial smooth muscles and mast cells / Z. Allakhverdi, M.R. Comeau, H.K. Jessup, G. Delespesse // *J Allergy Clin Immunol.* - 2009; 123. – P. - 958–960.
177. Kabata, H. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation / H. Kabata, K. Moro, K. Fukunaga [et al.] // *Nat Commun.* - 2013; 25. – P. -26-75.
178. Han, H. Thymic stromal lymphopoietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages / H. Han, M.B. Headley, W. Xu, M.R. Comeau [et al.] // *J Immunol.* - 2013; 190.- P.- 904–912.
179. Ying, S. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease / S. Ying, B. O'Connor, J. Ratoff [et al.] // *J Immunol.* - 2008; 181. - P. - 2790–2798.
180. Zhang, K. Constitutive and inducible thymic stromal lymphopoietin expression in human airway smooth muscle cells: role in chronic obstructive pulmonary disease / K. Zhang, L. Shan, M.S. Rahman [et al.] // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* - 2007; 293. – P. - 375–L382.
181. Shi, L. Local blockade of TSLP receptor alleviated allergic disease by regulating airway dendritic cells / L. Shi, S.W. Leu, F. Xu [et al.] // *Clin Immunol.* - 2008; 129. – P. - 202–210.
182. Kaur, M. Neutrophil chemotaxis caused by chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages: the role of CXCL8 and the receptors CXCR1/CXCR2 / M. Kaur, D. Singh // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2013; 347. –P. - 173–180.

183. Botelho, F.M. IL-1 $\alpha$ /IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice / F.M. Botelho, C.M. Bauer, D. Finch [et al.] // PLoS One. - 2011 №6. - e28457
184. Barnes, P.J. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease / P.J. Barnes // Am J Respir Cell Mol Biol. - 2009; 41. - P. - 631–638.
185. Di Stefano, A. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD / A. Di Stefano, G. Caramori, A. Barczyk [et al.] // Thorax. - 2014 Jan
186. Pauwels, N.S. Role of IL-1 $\alpha$  and the Nlrp3/caspase-1/IL-1 $\beta$  axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD / N.S. Pauwels, K.R. Bracke, L.L Dupont [et al.] // Eur Respir J. - 2011; 38. – P. - 1019–1028.
187. Singh, B. Association of severity of COPD with IgE and interleukin-1 beta / B. Singh, S. Arora, V. Khanna // Monaldi Arch Chest Dis. - 2010; 73. – P. - 86–87.
188. Botelho, F.M. Cigarette smoke-induced accumulation of lung dendritic cells is interleukin-1 $\alpha$ -dependent in mice / F.M. Botelho, J.K Nikota, C.M. Bauer [et al.] // Respir Res. – 2012, №13. – P. - 81.
189. Churg, A. The role of interleukin-1beta in murine cigarette smoke-induced emphysema and small airway remodeling / A. Churg, S. Zhou [et al.] // Am J Respir Cell Mol Biol. - 2009; 40. – P. - 482–490.
190. MedImmune, L.L.C. A to Evaluate the Efficacy of MEDI8968 in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (SPRING) [Accessed February 20, 2014]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01448850>.
191. Barceló, B. Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease / B. Barceló, J. Pons, A. Fuster [et al.] // Clin Exp Immunol. - 2006; 145. - P. - 474–479.
192. Bafadhel, M. Sputum IL-5 concentration is associated with a sputum eosinophilia and attenuated by corticosteroid therapy in COPD / M. Bafadhel, S. Saha, R. Siva [et al.] //Respiration. - 2009; 78. – P. - 256–262.

193. Bafadhel, M. Profiling of sputum inflammatory mediators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease / M. Bafadhel, M. McCormick, S. Saha [et al.] // *Respiration*. - 2012; 83. – P. -36–44.
194. Shukla, M. Carryover of cigarette smoke effects on hematopoietic cytokines to F1 mouse litters /M. Shukla, P. Kumar, V. Mishra [et al.] //*Mol Immunol*.- 2011; 48. – P. - 1809–1817.
195. Van der Deen, M. Reduced inflammatory response in cigarette smoke exposed Mrp1/Mdr1a/1b deficient mice / M. Van der Deen, W. Timens, H. Timmer-Bosscha [et al.] // *Respir Res*. - 2007; 8. – P. – 49
196. Vlahos, R. Neutralizing granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation / R. Vlahos, S. Bozinovski, S.P. Chan [et al.] //*Am J Respir Crit Care Med*. - 2010; 182. – P. - 34–40.
197. Puljic, R. Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF / R. Puljic, E. Benediktus, C. Plater-Zyberk [et al.] // *Eur J Pharmacol*. - 2007; 557. –P. - 230–235.
198. Freeman, C.M. Cytotoxic potential of lung CD8(+) T cells increases with chronic obstructive pulmonary disease severity and with in vitro stimulation by IL-18 or IL-15 / C.M. Freeman, M.K. Han, F.J. Martinez [et al.] // *J Immunol*. - 2010; 184. – P. - 6504–6513.
199. Cosio, M.G. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease / M.G. Cosio, M. Saetta, A. Agusti // *N Engl J Med*. -2009; 360. - P. - 2445–2454.
200. Wan, Y.Y. Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression /Y.Y. Wan, R.A. Flavell // *Proc. Am. Thorac. Soc*. - 2007; №4. P. - 271–276.
201. Moon, P.D. Naringenin suppresses the production of thymic stromal lymphopoietin through the blockade of RIP2 and caspase-1 signal cascade in mast cells / P.D. Moon, I.H. Choi, H.M. Kim // *Eur J Pharmacol*. - 2011; 671. – P.- 128–132.

202. Moon, P.D. Berberine inhibits the production of thymic stromal lymphopoietin by the blockade of caspase-1/NF- $\kappa$ B pathway in mast cells / P.H. Moon, I.H. Choi, H.M. Kim // *Int Immunopharmacol.* - 2011; №11. – P. - 1954–1959.

203. Moon, P.D. Thymic stromal lymphopoietin is expressed and produced by caspase-1/NF- $\kappa$ B pathway in mast cells / P.D. Moon, H.M. Kim // *Cytokine.* - 2011; 54. – P. - 239–243.

204. Moon, P.D. Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits the production of thymic stromal lymphopoietin by the blockade of caspase-1/NF- $\kappa$ B pathway in mast cells / P.D. Moon, I.H. Choi, H.M. Kim // *Amino Acids.* - 2012; 42.- P. - 2513–2519.

205. Allakhverdi, Z. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells / Z. Allakhverdi, M.R Comeau, H.K. Jessup [et al.] // *Exp Med.* - 2007; 204. – P. - 253–258.

206. Lee, H.C. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NF $\kappa$ B / H.C Lee, S.F. Ziegler // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2007; 104. – P. - 914–919.

207. Smelter, D.F. Thymic stromal lymphopoietin in cigarette smoke-exposed human airway smooth muscle / D.F. Smelter, V. Sathish, M.A. Thompson [et al.] // *J Immunol.* - 2010; 185. – P. - 3035–3040.

208. Bohle, B. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation / B. Bohle, T. Kinaciyan [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* - 2007 Sep; 120(3). – P. - 707-13.

209. Saha, S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in induced sputum and bronchial mucosa in asthma and COPD / S. Saha, C. Doe [et al.] // *Thorax.* - 2009 Aug; 64(8). – P. – 671 - 6.

210. Ziora, D. Correlation of exhaled nitric oxide with nitrogen oxides and selected cytokines in induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients / D. Ziora, S. Dworniczak [et al.] // *J Physiol Pharmacol.*- 2007 Nov. – P. – 791 - 9.

211. Barnes, P.J. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases / P.J. Barnes // *Cytokine Growth Factor Rev.* - 2003 Dec; 14 (6. – P. - 511-22.

212. Chung, K.F. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease / K.F. Chung // *Curr Drug Targets*. - 2006 Jun; 7 (6). – P. - 675-81.
213. Grumelli, S. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* / S. Grumelli [et al.] // 2004 №1, e8.
214. Hawrylowicz, C.M. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation / C.M. Hawrylowicz // *J Exp Med*. - 2005 Dec 5; 202 (11). - P. - 1459-63.
215. Barnes, P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease / P.J. Barnes // *Nature Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8, N 3. – P. 183–192.
216. Hiemstra, P.S. Altered macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease / P.S Hiemstra // *Ann Am Thorac Soc*. - 2013 Dec; 10. - P - 180-5.
217. Holz, O. Potential prognostic value of biomarkers in lavage, sputum and serum in a five year clinical follow-up of smokers with and without COPD / O. Holz, B. Waschki, S. Roepcke, H. Watz, G. Lauer [et al.] // *BMC Pulm Med*. - 2014 Mar 1;14(1):30.
218. Wen, Y. Assessment of airway inflammation using sputum, BAL, and endobronchial biopsies in current and ex-smokers with established COPD / Y. Wen, D.W. Reid, D. Zhang, C. Ward, R. Wood-Baker, E.H Walters // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. - 2010 Oct 5;5.- P - 327-34
219. Kosciuch, J. Comparison of airway wall remodeling in asthma and COPD: biopsy findings / J. Kosciuch, R. Krenke [et al.] // *Respir Care*. - 2012 Apr.- 57(4).- P. - 557-64.
220. Köktürk, N. The cellular inflammation of bronchial biopsies in chronic obstructive pulmonary diseases / N. Köktürk, T. Tatlıcioğlu, L. Memiş, G. Türkkani // *TuberkToraks*. - 2003. -51(2). P. - 123-31.

221. Soltani, A. Basement membrane and vascular remodelling in smokers and chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study / A. Soltani, D.W. Reid, S.S. Sohal // *Respir Res.* - 2010 Jul 30. -11. – P. -105 -111.
222. Lapperre, T.S. Smoking cessation and bronchial epithelial remodelling in COPD: a cross-sectional study / T.S. Lapperre, J.K. Sont [et al.] // *Respir Res.* - 2007 Nov 26.- P. - 85.
223. Lapperre, T.S. Small airways dysfunction and neutrophilic inflammation in bronchial biopsies and BAL in COPD / T.S. Lapperre, L.N. Willems, W. Timens [et al.] // *Chest.* - 2007 Jan. - 131(1). – P. -53-9.
224. Blidberg, K. Adhesion molecules in subjects with COPD and healthy non-smokers: a cross sectional parallel group study / K. Blidberg, L. Palmberg [et al.] // *Respir Res.* - 2013 May. – P. - 14-47.
225. Willemse, B.W. Association of current smoking with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asymptomatic smokers / B.W. Willemse [et al.] // *Respir Res.* - 2005 Apr 25. – Vol. 6. – P.-38.
226. Willemse, B.W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers / B. W. Willemse, B. Rutgers, W. Timens [et al.] // *Eur. Respir. J.* - November 2005. - vol. 26. – P. 835-845.
227. Magno, F. Contribution of bronchial biopsies in the evaluation of pathogenesis and progression of COPD / F. Magno, A. Di Stefano // *Monaldi Arch Chest Dis.* - 2007 Dec. -67(4). – P. - 229-33.
228. Di Stefano, A. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview / A. Di Stefano, G. Caramori [et al.] // *ClinExp Allergy.* - 2004 Aug. -34(8). –P.- 1156-67.
229. Gosman, M.M. Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD / M.M. Gosman, B.W. Willemse, W. Timens [et al.] // *Eur Respir J.* - 2006 Jan;27(1). – P. - 60-64.



230. Ekberg-Jansson, A. Bronchial mucosal mast cells in asymptomatic smokers relation to structure, lung function and emphysema / A. Ekberg-Jansson, K. Amin [et al.] // *Respir Med.* - 2005 Jan; 99(1). – P. -75-83.

231. Soltani, A. Mast cells in COPD airways: relationship to bronchodilator responsiveness and angiogenesis / A. Soltani, Y.P. Ewe [et al.] // *EurRespir J.* - 2012 Jun; 39(6). – P. - 1361-7.

232. Ройт, А. Основы иммунологии / А. Ройт. – М.: Медицина, 1991. – 328 с.

233. Блажко, В.И. Клеточный состав и содержание цитокинов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа у больных бронхиальной астмой с различной чувствительностью бронхиального дерева к метахолину / В.И. Блажко [и др.] // *Пульмонология.* – 2005. – № 1. – С. 21–23.

234. Holgate, S.T. The Epithelium and airway remodeling / S.T. Holgate [et al.] // *Eur. Respir. J.* - 2012. - 6(29). P. - 7–43.

235. Kubo, H. Takahashi T. The role of microparticles in chronic obstructive pulmonary disease / H. Kubo, T. Takahashi // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* 2014:303. doi:10.2147/copd.s38931.

236. Кузубова, Н.А. Сосудистые нарушения в легких при хронической обструктивной болезни легких как мишень для терапевтического воздействия / Н.А. Кузубова, Е.С. Лебедева, В.П.Золотницкая [и др.] // *Пульмонология.* - 2012; 4. – P. - 71-77

237. Rodella, L.F. Endothelin-1 as a potential marker of melatonin's therapeutic effects in smoking-induced vasculopathy / L.F. Rodella, G. Favero, C. Rossini [et al.] // *Life Sci.* - 2010 Oct 23. – 87 (17-18). - P. 558-64.

238. Геренг, Е.А. Клеточное звено и цитокиновый профиль лаважной жидкости при тяжелых формах бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Е.Б. Букреева [и др.] // *Медицина в Кузбассе.* – 2011; Том X № 1. – С. – 4-9.

239. Геренг, Е.А. Роль тканевых, клеточных и молекулярных механизмов в развитии различных вариантов воспаления бронхиальных путей: диссертация на

соискание доктора медицинских наук: 03.04.04; 14.01.25 / Геренг Елена Андреевна. - Томск, 2012. – 344 с.

240. Barreiro, E. Protein carbonylation and muscle function in COPD and other conditions/ E. Barreiro // *Mass Spectrom Rev.* - 2014 May-Jun; 33(3). – P.- 219-36

241. Romundstad, S. COPD and microalbuminuria: a 12-year follow-up study / S. Romundstad, T. Naustdal, P.R. Romundstad, H. Sorger, A. Langhammer, E. Barreiro // *Eur Respir J.* - 2014 Apr; 43 (4).- P. - 1042-50.

242. Engström, G. Plasma markers of inflammation and incidence of hospitalisations for COPD: results from a population-based cohort study / G. Engström, N. Segelstorm [et al.] // *Thorax.* - 2009 Mar; 64 (3). - P. - 211-5.

243. Чучалин, А.Г. Роль С-реактивного белка в диагностике бактериальной инфекции и пневмонии у пациентов с обострением хронической обструктивной болезни легких /А.Г. Чучалин, С.Н. Авдеев [и др.] // *Пульмонология.* - 2010. - N 2. - С.49-55.

244. Kobayashi, T. Interferon- $\beta$  augments eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells / T. Kobayashi, Y. Takaku, A. Yokote [et al.] // *Europ. Respiratory J.* - 2008. V. 32, № 6. - P. 1540—1547

245. Paczek, L. Trypsin, elastase, plasmin and MMP-9 activity in the serum during the human ageing process / L. Paczek, W. Michalska, I. Bartłomiejski // *Age Ageing.* - 2008. V. 37, № 3. - P. 318—323

246. Sandra, J. Neutrophil elastase-initiated EGFR/MEK/ERK signaling counteracts stabilizing effect of autocrine TGF- $\beta$  on tropoelastin mRNA in lung fibroblasts / J. Sandra, Di Camillo, Y.M. Shenghong [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006. V. 291, № 8. P. 232—243.

247. Comandini, A. Biomarkers of lung damage associated with tobacco smoke in induced sputum / A. Comandini, P. Rogliani, A. Nunziata [et al.] // *Respir Med.* – 2009. – Nov. - 103(11). – P. 1592 – 1613.

248. Bareła-Malczyńska, A.D. The use of induced sputum examination in respiratory system diseases / A.D. Bareła-Malczyńska, R. Chazan // *Pol Merkur Lekarski.* - 2011. - Feb. - 30(176). – P. - 126-131.

249. Yoshida, T. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease / T. Yoshida, R.M. Tuder // *Physiol Rev.* – 2007. - Jul; 87 (3). - P. - 1047-1082.
250. Виггинс, Дж. Бронхоальвеолярный лаваж. Методика и применение / Дж. Виггинс // *Пульмонология.* – 1991. – № 3. – С.43–46.
251. Полосухин, В.В. Диагностический бронхоальвеолярный лаваж / В.В. Полосухин, С.М. Егунова, С.Г. Чувакин. – Новосибирск: Наука, 1995. – 163 с.
252. Авдеев, С.Н. Применение метода индуцированной мокроты для оценки интенсивности воспаления дыхательных путей / С.Н. Авдеев [и др.] // *Пульмонология.* – 1998. – № 2. – С. 81–87
253. Волкова, Л.И. Характеристика клеточного и биохимического профиля индуцированной мокроты и крови у курящих и некурящих здоровых людей / Л.И. Волкова [и др.] // *Пульмонология.* – 2004. – № 2. – С. 78–83.
254. Лили, Р. Патологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лили. – М.: Мир, 1969. – 645 с.
255. Меркулов, Г.А. Курс патолого-гистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медицина. 1999. – 325 с.
256. Карупу, В.Я. Электронная микроскопия / В.Я. Карупу. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1984. – 208 с.
257. Техника электронной микроскопии / под ред. Кэй. – М.: Мир, 1985. – 406 с.
258. Голофеевский, В.Ю. Сочетанная окраска цитологических срезов основным коричневым и прочным зеленым / В.Ю. Голофеевский, С.Г. Щербак // *Архив анатомии, гистологии, эмбриологии.* – 1987. – Т. 92, № 4. – С. 101–102.
259. Глаголев, В.В. Геометрические методы количественного анализа агрегатов под микроскопом / В.В. Глаголев. – Львов, 1968. – 263 с.

260. Гуцол, А.А. Практическая морфометрия органов и тканей / А.А. Гуцол Б.Ю. Кондратьев. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988. – 136 с.
261. Автандилов, Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2006. – 192 с.
262. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
263. Автандилов, Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
264. Petropoulou, P. Measurement of both native and inactivated forms of alpha1-proteinase inhibitor in human inflammatory extracellular fluids / P. Petropoulou [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2003. – Vol. 30, N 9. – P.795–801.
265. Ямкина, Н.С. Некоторые факторы толерантности злостных курильщиков к развитию хронической обструктивной болезни легких: диссертация на соискание кандидата медицинских наук: 14.01.25 / Ямкина Наталья Сергеевна. - Томск, 2008. – 163 с.
266. Калманова, Е.Н. Исследование респираторной функции и функциональный диагноз в пульмонологии / Е.Н. Калманова, З.Р. Айсанов // РМЖ. 2000. №12. С. 510
267. Казанская, Г.М. Ультраструктурная организация капилляров в разных отделах сердца собак при искусственной иммерсионной гипотермии / Г.М. Казанская, Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, А.М. Волков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. - №2. – С. 211 – 216.
268. Cornwell, William D. Activation and polarization of circulating monocytes in severe chronic obstructive pulmonary disease / William D. Cornwell, V. Kim, X. Fan, M.E. Vega, F.V. Ramsey, G.J. Criner and T.J. Rogers // BMC Pulmonary Medicine. – 2018. - 18:101.- <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0664-y>