

РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В НЕБЛАГОПРИЯТНОМ ИСХОДЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

КАРЗАКОВА ЛУИЗА МИХАЙЛОВНА, ORCID ID: 0000-0002-5899-6352; SCOPUS Author ID: 56916027300, докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой внутренних болезней ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Минобрнауки России, Россия, 428015, Чебоксары, Московский пр., 15, тел. +7 (903) 358-82-89, e-mail: luizak58@mail.ru

АЛЕКСЕЕВА ЕВГЕНИЯ ПАВЛОВНА, ORCID ID: 0000-0002-3799-4278; ассистент кафедры внутренних болезней ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Минобрнауки России, Россия, 428015, Чебоксары, Московский пр., 15, тел. +7 (961) 340-05-80, e-mail: evgenia010307@mail.ru

КУДРЯШОВ СЕРГЕЙ ИГОРЕВИЧ, ORCID ID: 0000-0003-2277-9425, канд. мед. наук, доцент кафедры внутренних болезней ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Минобрнауки России, Россия, 428015, Чебоксары, Московский пр., 15, +7 (917) 652-34-99, e-mail: medicpro21@mail.ru

ЖУРАВЛЕВА НАДЕЖДА ВЛАДИМИРОВНА, ORCID ID: 0000-0001-6470-7724, канд. мед. наук, доцент кафедры внутренних болезней ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Минобрнауки России, Россия, 428015, Чебоксары, Московский пр., 15, +7 (903) 358-71-78, e-mail: zhuravlevanv@mail.ru

УХТЕРОВА НАДЕЖДА ДИМИТРИЕВНА, ORCID ID: 0000-0003-1808-6845; канд. мед. наук, доцент кафедры внутренних болезней ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Минобрнауки России, Россия, 428015, Чебоксары, Московский пр., 15, +7 (906) 136-73-41, e-mail: 55dd@mail.ru

АНДРЕЕВА НАТАЛИЯ ПЕТРОВНА, ORCID ID: 0000-0002-1989-3334; SCOPUS Author ID: 21733375100, канд. мед. наук, врач-аллерголог-иммунолог, БУ «Городская детская клиническая больница» Минздрава Чувашии, Россия, 428015, Чебоксары, пр.Тракторостроителей, 12, +7 (903) 358-27-02, e-mail: Nataliutt@ya.ru

Реферат. Цель исследования – изучение роли иммунологических механизмов в неблагоприятном исходе хронической обструктивной болезни легких. **Материал и методы.** В исследование включено 116 госпитализированных в 2005-2006 годах в пульмонологическое отделение больных по поводу обострения хронической обструктивной болезни легких легкого и среднетяжелого течения. Протокол исследования: больным хронической обструктивной болезнью легких проводили общеклинические и специальные (иммунологические) методы обследования. Инструментальные методы исследования включали спирографию, электрокардиографию, эхо-кардиографию, фибро-бронхоскопию, рентгенографию органов грудной клетки. После проведения диагностической бронхоскопии производили забор бронхоальвеолярной жидкости для цитологического и иммунологического исследования. На 1-2-е сутки стационарного лечения больным проводили иммунологические исследования: иммунофенотипирование мононуклеарных клеток, оценку фагоцитарной активности лейкоцитов в крови и бронхоальвеолярной жидкости, определение содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови и бронхоальвеолярной жидкости, исследование уровней цитокинов в сыворотке крови, бронхоальвеолярной жидкости и в супернатанте культуры мононуклеарных клеток в условиях их спонтанной продукции и при активации в реакции стимулированной митогеном (фитогемагглютинин «Difco» 5 мг/мл) пролиферации. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 10.0. В 2020 году была проведена оценка отдаленной выживаемости больных хронической обструктивной болезнью легких. Когорта больных была разделена на две группы. В первую группу (n=44) были включены выжившие, а в другую (n=72) – умершие к 2020 году пациенты, и было проведено ретроспективное сравнение изучаемых показателей, определенных в момент обострения хронической обструктивной болезни легких в 2005-2006 годах, в данных группах пациентов. **Результаты и их обсуждение.** У выживших пациентов цитограмма бронхоальвеолярной жидкости отличалась более высоким показателем содержания макрофагов и увеличенным числом НСТ-положительных клеток этой популяции при уменьшенном количестве нейтрофилов как в крови, так и в бронхоальвеолярной жидкости. У умерших были повышены уровни IgM и IgA в сыворотке крови и бронхоальвеолярной жидкости. Результаты изучения продукции цитокинов в культурах мононуклеарных клеток *in vitro* свидетельствовали о том, что в группе умерших соотношение IFN- γ /IL-4 в условиях спонтанной продукции цитокинов было выше, по сравнению с показателем выживших больных. Этот факт указывает на поляризацию иммунного ответа умерших больных в направлении клеточного типа, опосредованного Th1-клетками, что подтверждается особенностями цитокинового профиля бронхоальвеолярной жидкости у умерших – существенным повышением значения IFN- γ /IL-4 относительно показателей у выживших. **Выводы.** Неблагоприятный исход хронической обструктивной болезни легких связан с увеличением числа нейтрофильных клеток в бронхоальвеолярной жидкости, крови, преобладанием активации Th1-типа адаптивного иммунитета на местном уровне и активацией как клеточного, так и гуморального механизмов адаптивного иммунитета на системном уровне. Усиление активности врожденного иммунитета при обострении хронической обструктивной болезни легких, проявляющееся увеличением числа и метаболической активности макрофагов, ассоциировано с долговременной выживаемостью больных.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, смертность, исход болезни, цитокины, Th1- клетки.

Для ссылки: Роль иммунологических факторов в неблагоприятном исходе хронической обструктивной болезни легких / Л.М. Карзакова, Е.П. Алексеева, С.И. Кудряшов [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2022. – Т. 15, вып. 1. – С.52–61. DOI: 10.20969/VSKM.2022.15(1).52-61

THE ROLE OF IMMUNOLOGICAL FACTORS IN THE UNFAVORABLE OUTCOME OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

KARZAKOVA LOUISE M., ORCID ID: 0000-0002-5899-6352; SCOPUS Author ID: 56916027300, D. Med. Sci., Professor, Head of the Department of Internal Medicine, Chuvashskii State University, 428015 Russia, Cheboksary, Moskovskii' pr., 15, +7 (903) 358-82-89, e-mail: luizak58@mail.ru.

ALEKSEEVA EVGENIYA P., ORCID ID: 0000-0002-3799-4278; Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Chuvashskii State University, 428015 Russia, Cheboksary, Moskovskii' pr., 15, +7 (961) 340-05-80, e-mail: evgenia010307@mail.ru

KUDRYASHOV SERGEY I., ORCID ID: 0000-0003-2277-9425; C. Med. Sci., Associate Professor, Department of Internal Medicine, Chuvashskii State University, 428015 Russia, Cheboksary, Moskovskii' pr., 15, +7 (917) 652-34-99, e-mail: medicpro21@mail.ru

ZHURAVLEVA NADEZHDA V., ORCID ID: 0000-0001-6470-7724; C. Med. Sci., Associate Professor, Department of Internal Medicine, Chuvashskii State University, 428015 Russia, Cheboksary, Moskovskii' pr., 15, +7 (903) 358-71-78, e-mail: zhuravlevanv@mail.ru

UKHTEROVA NADEZHDA D., ORCID ID: 0000-0003-1808-6845; C. Med. Sci., Associate Professor, Department of Internal Medicine, Chuvashskii State University, 428015 Russia, Cheboksary, Moskovskii' pr., 15, +7 (906) 136-73-41; e-mail: 55dd@mail.ru

ANDREEVA NATALIA P., ORCID ID: 0000-0002-1989-3334; SCOPUS Author ID: 21733375100, C. Med. Sci., Allergist/Immunologist, City Children's Clinical Hospital, Russia, 428015, Cheboksary, Traktorostroiteley str., 12, +7 (903) 358-27-02; e-mail: Nataliutt@ya.ru

Abstract. Aim. The aim of the research was to study the role of immunological mechanisms in the unfavorable outcome of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Material and methods.** The research included 116 patients hospitalized in 2005-2006 in the pulmonology department of patients with the exacerbation of mild and moderate COPD. Research protocol: general clinical and special (immunological) methods of examination were performed in patients with COPD. Instrumental research methods included: spirometry, ECG, EchoCG, fibrobronchoscopy, chest X-ray. After diagnostic bronchoscopy, bronchoalveolar fluid (BAF) was taken for cytological and immunological examination. On the first and second days of inpatient treatment, patients underwent immunological studies: immunophenotyping of mononuclear cells (MNC), assessment of phagocytic activity of leukocytes (latex test, nitroblue tetrazolium (NBT) test) in blood and BAF, determination of the content of immunoglobulins in blood serum and BAF, study of cytokine levels in blood serum, BAF and MNC culture supernatant under conditions of their spontaneous production and activation in the mitogen-stimulated (phytohemagglutinin "Difco" 5 mg/ml) proliferation. Statistical data processing was carried out using the Statistica 10.0 program. In 2020, the long-term survival of COPD patients was assessed. The cohort of patients was divided into two groups. Survivors were included in the first group (n=44), and patients who died by 2020 were included in the other group (n=72). The retrospective comparison of the studied indicators was determined at the time of COPD exacerbation in 2005-2006 in these patient groups. **Results and discussion.** In the surviving patients, the BAF cytogram was distinguished by the higher macrophage content and the increased number of NBT-positive cells in this population with the reduced neutrophil content in both blood and BAF. The deceased had elevated levels of IgM and IgA in the blood serum and BAF. The results of the study of cytokine production in MNC cultures in vitro indicate that the ratio of IFN- γ /IL-4 in the conditions of spontaneous cytokine production was higher in the deceased compared with the indicators of the surviving patients. This fact indicates the polarization of the immune response of the deceased in the direction of the cell type mediated by Th1 cells, which is confirmed by the peculiarities of the BAF cytokine profile in the deceased – the significant increase in the value of IFN- γ /IL-4 relative to the indicators in the survivors. **Conclusion.** The unfavorable outcome of COPD is associated with the increase in the number of neutrophil cells in BAF, in the blood, with the predominance of Th1-type activation of adaptive immunity at the local level and activation of both cellular and humoral mechanisms of adaptive immunity at the systemic level. The increased activity of innate immunity in COPD exacerbation, manifested by the increase in the number and metabolic activity of macrophages, is associated with the long-term survival of patients.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, mortality, disease outcome, cytokines, Th1 cells.

For reference: Karzakova LM, Alekseeva EP, Kudryashov SI, Zhuravleva NV, Ukhterova ND, Andreeva NP. The role of immunological factors in the unfavorable outcome of chronic obstructive pulmonary disease. The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine. 2022;15(1):52–61. DOI: 10.20969/VSKM.2022.15(1).51-62.

Введение. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – одно из наиболее часто встречающихся заболеваний в мире – является острой проблемой современной медицины в связи с высоким риском инвалидизации и преждевременной смертности лиц, подверженных данному заболеванию. ХОБЛ уносит ежегодно миллионы жизней больных и к настоящему времени занимает третью позицию в структуре смертности населения мира [1]. Существующие

методы лечения ХОБЛ незначительно влияют на ее исход. ХОБЛ характеризуется стойким воспалением легочной ткани, закупоркой мелких дыхательных путей (обструктивный бронхит) и их структурными изменениями (эмфизема) [2]. Табакокурение является фактором риска и основной причиной данного заболевания [3]. Отказ от курения благотворно влияет на функции легких [4]. Однако прекращение курения не избавляет пациентов с ХОБЛ от воспалительного

процесса в легочной ткани [5]. Персистирующее воспаление легких после прекращения курения и наличие хорошо организованных лимфоидных фолликулов вокруг мелких дыхательных путей и паренхимы легких у пациентов с ХОБЛ указывают на вовлеченность в патологический процесс адаптивных иммунных реакций на антигены инфекционных патогенов и сапрофитной микрофлоры легких, а также – на аутоантигены [3]. Зачастую один - два повторяющихся эпизода тяжелого обострения заболевания могут оказаться фатальными для больных [6, 7, 8]. В то же время у части лиц заболевание имеет благоприятное течение. К настоящему времени нет целостного представления о причинах прогрессирования и неблагоприятного исхода ХОБЛ [9]. Вполне вероятно, что иммунологическая природа патогенеза заболевания может обуславливать его исход.

Цель исследования: изучение влияния иммунологических механизмов, реализующихся на системном и местном уровнях, на исход ХОБЛ.

Материал и методы. Исследование было начато в 2005 и окончено в 2020 году. Группа исследования включала 116 госпитализированных в 2005-2006 годах в пульмонологическое отделение Республиканской клинической больницы Минздрава Чувашии больных по поводу обострения ХОБЛ легкого и среднетяжелого течения. Диагноз был поставлен в соответствии с рекомендациями международного программного документа по ХОБЛ – GOLD (2006). Обострение ХОБЛ констатировали при обнаружении критериев Anthonisen [10]. При отборе пациентов руководствовались следующими критериями включения: (1) ХОБЛ I и II стадии; (Объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1)/ Форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) < 0,70), ОФВ1 ≥ 80% для больных GOLD I и 50% ≤ ОФВ1 < 80% для больных GOLD II; (2) отсутствие в анамнезе фактов применения антибиотиков, глюкокортикостероидов в течение 2 недель до начала исследования; (3) информированное согласие на добровольное участие в исследовании. Критериями исключения служили профессиональные болезни, связанные с вдыханием токсичных веществ, ХОБЛ III и IV стадии, микобактериальная инфекция, бронхоэктазы, неврологические заболевания, дисфункции органов сердечно-сосудистой системы, печени и почек, психические заболевания, сахарный диабет, когнитивные нарушения. В 2020 году была проведена оценка отдаленной выживаемости больных ХОБЛ, и с целью дальнейшего продолжения исследования когорта включенных в исследование больных была разделена на две группы. В первую группу были включены выжившие, а в другую – умершие к 2020 году пациенты, и было проведено ретроспективное сравнение изучаемых показателей, определенных в момент обострения ХОБЛ в 2005-2006 гг., в данных группах пациентов. Контрольную группу составили 40 практически здоровых лиц с нормальной функци-

ей дыхания. В исследование включали лишь тех пациентов и те здоровые лица, которые подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен на заседании Местного этического комитета, функционирующего на медицинском факультете ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова». В таблице 1 представлены данные, характеризующие обследованные группы.

Больным ХОБЛ проводили общеклинические (инструментальные, лабораторные) и специальные (иммунологические) методы обследования.

Инструментальные методы исследования включали спирографию, электрокардиограмму, эхокардиоскопию, фибробронхоскопию, рентгенографию органов грудной клетки, при наличии показаний рентгенконтрастную бронхографию. После проведения диагностической бронхоскопии производили забор бронхоальвеолярной жидкости (БАЖ) из участка легкого с помощью вакуумного контура путем продвижения бронхоскопа до «заклинивания» в сегментарный или субсегментарный бронх. Аспирированную жидкость подвергали цитологическому и иммунологическому исследованию. Образцы БАЖ, предназначенные для определения иммуноглобулинов и цитокинов, замораживали и хранили при -70°С.

Общеклинические лабораторные исследования крови, мокроты, мочи осуществляли по общепринятым унифицированным методикам исследований [11].

Иммунологические исследования включали иммунофенотипирование мононуклеарных клеток (МНК); оценку фагоцитарной активности лейкоцитов (пате́кс-тест, тест восстановления нитросинего тетразолия – НСТ-тест) в крови и БАЖ; определение содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови и иммуноглобулинов в сыворотке крови, БАЖ; исследование уровней цитокинов в сыворотке крови, БАЖ и в супернатанте культуры МНК в условиях их спонтанной продукции и при активации в реакции стимулированной митогеном (фитогемагглютинин «Difco» 5 мг/мл) пролиферации по стандартным методикам, описанным нами ранее [12].

Забор образцов крови, БАЖ, мокроты для лабораторных исследований проводили на 1-2-е сутки стационарного лечения. Венозную кровь забирали утром натощак из локтевой вены в объеме 5 мл с гепарином (20 Ед/мл) для иммунофенотипирования мононуклеарных клеток (МНК), определения фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса нейтрофилов, 15 мл с гепарином (10 Ед/мл) – для постановки митоген-стимулированной лимфопротерапии, 4 мл – в сухую пробирку для определения сыворотки и определения содержания в сыворотке иммуноглобулинов, ЦИК, цитокинов. Образцы крови центрифугировали при 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут, отцентрифу-

Клиническая характеристика групп обследования (по состоянию на 2005 - 2006 гг.)

Clinical characteristics of the examination groups (as of 2005 - 2006)

Показатель	Контрольная группа	Больные ХОБЛ		
		Умершие	Выжившие	
Количество	40	72	44	
Пол (мужчина/женщина)	32/8	64/8	28/16	$\chi^2 < 0,01$
Курящие	4	37	12	$\chi^2 < 0,01$
Бывшие курильщики (прекратившие табакокурение)	14	27	30	$\chi^2 > 0,05$
Не курящие	22	8	2	$\chi^2 > 0,05$
Возраст (года)	51,5 ± 2,8	59,55 ± 8,35	52,54 ± 6,09	p < 0,001
Индекс курения (пачка/год)	13,1 ± 4,1	24,3 ± 6,5	18,2 ± 4,3	p < 0,001
ОФВ1 постбронходилатационный*	98,7 ± 11,5	46,85 ± 17,20	60,85 ± 14,90	p < 0,001
ОФВ1/ФЖЕЛ *	96,6 ± 11,9	63,09 ± 15,75	76,94 ± 13,39	p < 0,001
Максимальная объемная скорость воздуха при выдохе 25 % от ФЖЕЛ (МОС 25)*	102,1 ± 11,1	43,24 ± 17,96	58,66 ± 19,26	p < 0,001
Максимальная объемная скорость воздуха при выдохе 50 % от ФЖЕЛ (МОС 50)*	99,5 ± 10,7	28,75 ± 18,28	47,64 ± 16,59	p < 0,001
Максимальная объемная скорость воздуха при выдохе 75 % от ФЖЕЛ (МОС 75) *	94,2 ± 12,3	28,10 ± 17,74	46,73 ± 21,06	p < 0,001
Оценочная шкала САТ, баллы	0	10,1 ± 1,6	8,5 ± 0,9	p < 0,001

Примечания: * - значения показателей выражены в процентах от рассчитанных должных величин; p – степень достоверности различий количественных показателей в группах больных ХОБЛ; χ^2 - степень достоверности различия качественных (категориальных) показателей в группах больных ХОБЛ.

гированную сыворотку замораживали и хранили при -70°C и размораживали перед использованием для определения иммуноглобулинов и цитокинов. ЦИК исследовали в день забора крови. МНК выделяли из венозной крови больных при центрифугировании в градиенте плотности фико-колл-верографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) в течение 45 мин при 400g при температуре 10°C .

Статистический анализ осуществляли, используя программу Statistica 10.0. Достоверность различий количественных показателей в независимых группах оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, а в сопряженных выборках – с помощью парного критерия Стьюдента. Достоверность разницы качественных (альтернативных) показателей обследованных оценивали по критерию χ^2 . Статистически значимое различие определялось при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На момент начала исследования в 2005–2006 гг. в составе исследуемой когорты преобладали больные со среднетяжелой ХОБЛ в связи с тем, что на стадии легкого течения заболевание диагностировалось чрезвычайно редко. Результаты исследования показали, что к моменту завершения исследования в 2020 году (в среднем через 15 лет от начала наблюдения) из 116 пациентов с

ХОБЛ легкого и среднетяжелого течения в живых остались 44 пациента – 37,9% от общего числа больных. Средняя продолжительность жизни пациентов с момента установления диагноза ХОБЛ у умерших больных составила 12,5 года. Среди умерших пациентов оказалось больше курящих, лиц мужского пола и более старшего возраста (см. табл. 1).

Ретроспективное изучение показателей общего анализа мокроты не выявило различий в значениях показателей у умерших и выживших больных в период госпитализации по поводу обострения ХОБЛ в 2005–2006 гг. (табл. 2). Однако, обнаруживались определенные различия в показателях БАЖ. В качестве контрольных показателей БАЖ использовали показатели здоровых лиц, известные из литературных источников [13, 14, 15, 16]. У выживших пациентов цитогарма БАЖ отличалась более высоким содержанием макрофагов и увеличенным числом НСТ-положительных клеток этой популяции при уменьшенном содержании нейтрофилов. При этом у умерших пациентов были выше уровни slgA , IgA и IgM , а уровень IgG , напротив, ниже. Что касается содержания в БАЖ цитокинов, то уровни всех исследованных цитокинов у умерших превышали соответствующие показатели у выживших паци-

ентов. Соотношение уровней основных цитокинов – IFN- γ и IL-4, характеризующих активность

Th1- и Th2-клеток соответственно, было выше в группе умерших больных.

Таблица 2.

Показатели лабораторного анализа мокроты и бронхоальвеолярной жидкости у умерших и выживших больных ХОБЛ

Table 2.

Indicators of laboratory analysis of sputum and bronchoalveolar fluid in deceased and surviving COPD patients

Показатель	Здоровые n=40	Больные ХОБЛ		p
		Умершие n=72	Выжившие n=44	
	M \pm SD	M \pm SD	M \pm SD	
Мокрота				
Лейкоциты, 106/мл	0,5 \pm 0,2	47,70 \pm 38,41***	41,62 \pm 32,04***	>0,05
Альвеолярные макрофаги, 106/мл	0,8 \pm 0,3	7,33 \pm 4,09***	6,7 \pm 14,71***	>0,05
БАЖ				
Нейтрофилы, %	4,1 \pm 0,49 [13]	66,68 \pm 31,94***	46,82 \pm 18,50***	<0,01
Фагоцитарный индекс нейтрофилов (ФИН)	34,05 \pm 3,1[13]	21,56 \pm 13,8***	20,43 \pm 11,85***	>0,05
Показатель НСТ-теста нейтрофилов (НСТН), %	-	5,63 \pm 3,45	6,98 \pm 4,65	>0,05
Альвеолярные макрофаги, %	64,60 \pm 2,04[13]	9,928 \pm 8,46***	19,28 \pm 16,21***	<0,01
Мастоциты, %	0,06 \pm 0,16 [14]	0,25 \pm 0,60***	0,22 \pm 0,61***	>0,05
Фагоцитарный индекс макрофагов (ФИМ), %	55,5 \pm 3,3[13]	30,44 \pm 17,37***	33,16 \pm 17,99***	>0,05
Показатель НСТ-теста макрофагов (НСТМ), %	50,6 \pm 16,2[13]	16,79 \pm 9,03***	25,23 \pm 14,9***	<0,05
sIgA, нг/мл	7200 \pm 1000[15]	63159 \pm 22287***	39671 \pm 12872***	<0,001
IgG, г/л	0,45 \pm 0,04[13]	4,33 \pm 1,11***	9,70 \pm 2,00***	<0,001
IgA, г/л	0,2 \pm 0,02[13]	2,98 \pm 0,71***	1,44 \pm 0,75***	<0,001
IgM, г/л	0 [13]	17,86 \pm 4,78***	9,46 \pm 2,89***	<0,001
IL-4, пг/мл	5,9 \pm 1,0 [16]	56,2 \pm 18,2***	35,6 \pm 8,1***	<0,001
IL-8, пг/мл	159 \pm 23 [16]	4230 \pm 2406***	2703 \pm 1156***	<0,001
IFN- γ , г/л	2,30 \pm 0,10 [16]	633 \pm 202***	171 \pm 60***	<0,001
IFN- γ /IL-4	-	11,32 \pm 2,31	4,82 \pm 1,12	<0,001

Примечания: p – уровень статистической значимости различия между значениями показателей групп пациентов; *** - p<0,001 – отличие относительно группы здоровых.

Выявлен ряд различий в показателях гемограмм между обследованными группами больных (таблица 3). Так, у умерших больных показатели содержания нейтрофилов, СОЭ превышали соответствующие показатели у выживших, в то время как число лимфоцитов и моноцитов было ниже.

В связи с установленными различиями в значениях соотношения IFN- γ /IL-4 между выжившими и умершими пациентами особый интерес заслуживает анализ популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов (таблица 4), выя-

вивший у умерших превышение числа клеток с хелперным фенотипом относительно показателя группы выживших пациентов. Кроме того, у умерших обнаруживались повышенные уровни сывороточных IgM, IgA и ЦИК. Сравнение показателей цитокинового профиля показало, что у умерших пациентов были более высокие уровни циркулирующих в крови цитокинов - IFN- γ и IL-4 по сравнению с таковыми у выживших больных. Уровни других цитокинов не различались в группах.

Статистически значимые различия в показателях гемограммы в группах умерших и выживших больных ХОБЛ

Table 3.

Statistically significant differences in hemogram indices in the groups of deceased and surviving COPD patients

Показатель	Здоровые n=40	Больные ХОБЛ		p
		Умершие n=72	Выжившие n=44	
	M±SD	M±SD	M±SD	
Лейкоциты, абс*.	5,38±0,96	7,75±2,69***	6,58±2,15**	0,019
Нейтрофилы палочкоядерные, %	4,7±2,4	7,37±5,14***	4,67±4,33	0,005
Нейтрофилы сегментоядерные, %	52,5±5,6	51,43±13,18	45,71±12,01**	0,019
Нейтрофилы сегментоядерные, абс*.	2,84±0,66	3,68±2,03**	2,88±1,15	0,014
Лимфоциты, абс*.	1,65±0,28	1,98±0,47***	2,31±0,98***	0,022
Моноциты, %	4,52±1,90	6,38±2,79***	8,41±3,80***	0,002
Моноциты, абс*.	0,22±0,08	0,41±0,19***	0,53±0,27***	0,007
СОЭ, мм/ч	6,5±3,1	23,68±21,60***	13,65±10,55***	0,003

Примечания: *абс. – абсолютное значение (×10⁹/л); p – уровень статистической значимости различий между значениями показателей групп пациентов; ** - p<0,01 отличие относительно группы здоровых, *** - p<0,001 отличие относительно группы здоровых.

Результаты изучения содержания цитокинов в супернатанте культивированных в течение 24 часов МНК демонстрировали превышение спонтанных уровней IL-4 и IFN- γ , а также митоген-стимулированного уровня IL-4 в группе умерших больных относительно показателей выживших. Примечательно, что продукция IL-4 не повышалась в ответ на стимуляцию митогеном ФГА ни у здоровых, ни в группах больных, в то время как стимулированные уровни другого цитокина – IFN- γ – превышали спонтанные уровни в 4,2 раза у здоровых, в 4,6 раза в группе умерших и в 10 раз в группе выживших больных. При этом отношение IFN- γ /IL-4 в условиях спонтанной продукции цитокинов в культурах МНК было повышено у умерших больных относительно показателя здоровых, а у выживших не отличалось от аналогичного показателя группы здоровых лиц. В то же время значение IFN- γ /IL-4 в стимулированных культурах у умерших было меньше по сравнению с показателем в группе выживших пациентов.

Результаты изучения продукции цитокинов в культурах МНК in vitro свидетельствуют о том, что МНК (лимфоциты, моноциты) у пациентов с обострением ХОБЛ находятся в активированном состоянии, о чем свидетельствуют повышенные относительно показателей здоровых спонтанные уровни IL-4 и IFN- γ . Данные показатели в группе умерших выше, следовательно МНК активированы в большей степени, чем у выживших. Тот факт, что соотношение IFN- γ /IL-4 в условиях спонтанной продукции цитокинов выше у умерших, по сравнению с показателями здоровых и выживших больных, свидетельствует

о преимущественном синтезе у умерших IFN- γ , продуцируемого в основном активированными Th1-клетками. В результате стимуляции митогеном ФГА соотношение IFN- γ /IL-4 повышается у умерших в 4 раза, в то время как у выживших в 9,3 раза. Эти данные позволяют думать о том, что МНК у умерших изначально находятся в состоянии выраженной активности, и стимуляция их митогеном не вызывает значительного прироста продукции IFN- γ , а у выживших больных МНК умеренно активированы и способны при обработке ФГА отвечать усиленным образованием данного цитокина. Основным выводом из результатов изучения продукции цитокинов в культурах МНК in vitro заключается в том, что иммунный ответ умерших больных поляризован по клеточному типу, опосредованному Th1-клетками. Это подтверждается особенностями цитокинового профиля БАЗ у умерших – существенным преобладанием содержания IFN- γ (в 3,7 раза превышающего уровень в группе выживших больных), обуславливающим превышение у умерших среднего значения IFN- γ /IL-4 более чем вдвое соответствующего показателя у выживших. Активация Th1-функции у больных ХОБЛ может быть связана с аутоиммунным поражением дыхательных путей и паренхимы легких, индуцированным поллютантами. Ранее было доказано, что в иммунопатогенезе ХОБЛ большую роль играет дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов, накопление в легочной ткани CD4⁺ - Т-хелперных клеток, в частности Th1 и Th17 субпопуляций [3, 17]. Существенно повышенное соотношение CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺, обнаруженное у умерших больных, также может быть связано с активаци-

Основные показатели адаптивного иммунитета и цитокинового профиля у умерших и выживших больных ХОБЛ

Table 4.

The main indicators of adaptive immunity and cytokine profile in deceased and surviving COPD patients

Показатель	Здоровые n=40	Больные ХОБЛ		p
		Умершие n=72	Выжившие n=44	
	M±SD	M±SD	M±SD	
Кровь				
CD3 ⁺ , %	62,5±6,4	59,92±9,17	51,60±11,74***	0,001
CD20 ⁺ , %	14,1±4,1	16,00±5,65	16,80±9,53	0,648
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	37,0±6,33	36,64±9,67	29,20±7,87***	0,001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	24,3±3,2	22,62±4,36	24,57±6,99	0,138
CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	1,50±0,32	1,62±0,69	1,26±0,32***	0,001
CD95 ⁺ , %	19,3±4,76	17,40±6,58	15,50±6,44**	0,163
IgM, г/л	1,14±0,21	1,78±0,92***	1,39±0,46***	0,009
IgG, г/л	11,6±1,4	12,42±5,16	12,29±4,24	0,923
IgA, г/л	1,76±0,47	3,42±2,27***	2,61±1,31**	0,006
ЦИК, у. ед.	8,6±4,1	14,15±9,98***	10,43±5,59	0,040
IL-4, пг/мл	1,75±0,5	11,69±4,79***	7,86±1,90***	0,001
IFN-γ, пг/мл	6,2±2,1	125,93±72,19***	86,46±13,25***	0,018
IFN-γ/ IL-4	3,5±0,8	11,2±5,2***	11,0±3,2***	NS
IL-8, пг/мл	2,6±0,7	29,42±54,86***	7,97±3,85***	0,062
IL-1β, пг/мл	0,4±0,1	204,9±294,1***	195,7±281,4***	0,915
Супернатанты культуральных МНК				
IL-4 спонт.1	14,6±3,12	26,6±4,64***	19,54±5,34***	0,001
IL-4 стимул.2	15,2±3,17	29,5±4,53***	21,54±4,51***	0,001
IFN-γ спонт.1	17,95±5,24	46,1±9,52***	20,62±5,56*	0,001
IFN-γ стимул.2	73,9±21,17 ^{ooo}	213,4±42,1 ^{****ooo}	220,1±51,9 ^{****ooo}	NS
IFN-γ/ IL-4 спонт.1	1,2±0,3	1,8±0,52**	1,11±0,33	0,001
IFN-γ/ IL-4 стимул.2	4,6±1,1 ^{ooo}	7,31±1,38 ^{****ooo}	10,5±0,69***	0,001

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между значениями показателей групп пациентов; * - p<0,05 различие показателей в группах больных относительно здоровых по t-критерию Стьюдента; ** - p<0,01 различие показателей в группах больных относительно здоровых по t-критерию Стьюдента; *** - p<0,001 различие показателей в группах больных относительно здоровых по t-критерию Стьюдента; ^{ooo} - p<0,001 различия стимулированных уровней цитокинов и их соотношений относительно соответствующих спонтанных уровней по парному критерию Стьюдента; 1 - спонт. – концентрация цитокина в супернатанте интактных культур МНК; 2 - стимул. – концентрация цитокина в супернатанте ФГА-стимулированных культур МНК.

ей Th1-клеток. С прогрессированием заболевания первоначальное воспаление легких становится системным, вызывая глубокие изменения в функциях иммунных клеток и на организменном уровне с развитием сердечно-сосудистых осложнений, анорексии, саркопении [18, 19]. Выявленные на местном уровне особенности продукции цитокинов, свидетельствующие о поляризации иммунного ответа у умерших по типу преобладания активности Th1-клеток, нивелируются на системном уровне. Так, анализ уровней циркулирующих в крови цитокинов показал, что у умерших умеренно повышены относительно показателей группы выживших уровни цитокинов IL-4, IFN-γ, а

среднее значение соотношения IFN-γ/ IL-4 не отличается от значения аналогичного показателя у выживших больных. К тому же у умерших были повышенными относительно значений у выживших спонтанные и стимулированные уровни IL-4 в супернатантах культур МНК, что позволяет думать об активации и гуморального компонента адаптивного иммунитета, связанного с функцией Th2-клеток. Действительно, рядом авторов были представлены данные, свидетельствующие об участии аутоиммунных реакций гуморального типа в развитии эмфиземы легких, повреждении дыхательных путей при ХОБЛ [20, 21]. В частности, Lee S.H. и соавторы сообщили об обнаруже-

нии антител против эластина, внеклеточного белка, важного для целостности легких [21]. Другая группа исследователей опубликовала в 2016 году данные об обнаружении у больных ХОБЛ циркулирующих в крови антител IgG и IgA, направленных против эпителиальных клеток бронхов. Авторы привели доказательства корреляции повышения уровней выявленных антител с тяжелыми стадиями ХОБЛ – GOLD III и GOLD IV [20].

Следствием активации гуморального иммунитета у умерших является обнаруженное в ходе исследования повышение уровней IgM и IgA в БАЖ на фоне снижения IgG. Эти данные свидетельствуют об активации выработки ранних иммуноглобулинов – IgM, а также характерных для поражения слизистой оболочки респираторного тракта IgA. Обнаруженные особенности гуморального звена иммунитета на системном уровне (повышение уровня циркулирующих в крови IgM и IgA) подтверждают иммунологические закономерности, выявленные на местном уровне. Более выраженная активация гуморального адаптивного иммунитета у умерших по сравнению с выжившими, по всей видимости, связана с более выраженной реакцией на бактериальную инфекцию в период обострения в условиях недостаточной активации врожденного иммунитета. О последнем свидетельствуют снижение содержания и метаболической активности альвеолярных макрофагов в БАЖ (уменьшение числа НСТ-положительных клеток), уменьшение числа моноцитов в периферической крови по сравнению с показателями выживших пациентов. При этом у умерших было увеличено содержание нейтрофильных лейкоцитов в БАЖ и крови. Нейтрофилы являются первыми защитными клетками, рекрутируемыми в ткани после инфекции, где, как считалось, их роль заключается в устранении вторгающихся патогенов с помощью таких механизмов, как генерация активных форм кислорода и высвобождение предварительно сформированных окислителей и протеолитических ферментов из гранул [22]. Однако активированные в ответ на инфекцию или на продукцию провоспалительных цитокинов нейтрофилы разрушаются и высвобождают из гранул ДНК, гистоновые белки, протеолитические ферменты, которые организуются во внеклеточном пространстве в виде объемных сетеподобных структур (NETs), получивших название «нейтрофильные внеклеточные ловушки». Гистоны в составе подобных сетеподобных структур обладают выраженным цитотоксическим действием на эндотелиальные и эпителиальные клетки. При достаточно большом накоплении этих структур усиливается воспалительный процесс, разрушаются клетки и ткани легких. Описанное повреждение тканей, опосредованное нейтрофилами, известно как «парадокс нейтрофильных клеток», при котором защищающие клетки становятся «врагами» [23]. Согласно результатам исследования Dicker A.J.

и соавторов, накопление нейтрофильных внеклеточных ловушек в мокроте у больных ХОБЛ связано с нарушением фагоцитарной функции нейтрофилов, высоким риском обострений и прогрессированием заболевания [24]. Кроме того, нейтрофилы при ХОБЛ могут быть мишенями аутоиммунных реакций. Об этом свидетельствует обнаружение у больных ХОБЛ аутоантител IgG против ряда специфических белков нейтрофильных гранул, таких как CTSH, FUCA2, LTF, MMP9, PLAUR, PRTN3, TIMP2 и TNFSF14, в то время как у здоровых курящих, не болеющих ХОБЛ, подобного рода антитела отсутствовали [25]. Возможно, что при дегрануляции нейтрофилов, возникающей в результате их фагоцитарной функции в легких при обострении ХОБЛ в ответ на инфекцию, высвобождаются белки нейтрофильных гранул, выступающие в роли аутоантигенов, что усиливает соответствующие аутоиммунные реакции.

Таким образом, результаты настоящего исследования продемонстрировали связь исхода ХОБЛ с иммунологическими механизмами, реализующимися на местном и системном уровнях. Полученные данные свидетельствуют о некоторых различиях между местными и системными реакциями. У умерших пациентов выявлена выраженная поляризация иммунного ответа по типу преобладания Th1-функции на местном уровне, а на системном уровне активированы и клеточный, и гуморальный механизмы адаптивного иммунитета, что позволяет предположить, что активация гуморального иммунитета развивается позже. Можно думать, что активация гуморального иммунитета на системном уровне является результатом какой-то сопутствующей патологии, которая затем поражает легкие. Однако правомочно и другое предположение, что активация иммунитета на системном уровне (повышение содержания циркулирующих в крови цитокинов, иммуноглобулинов) связана с проникновением цитокинов из дыхательных путей вследствие активации местного иммунитета. На сегодня нет данных, подтверждающих или опровергающих это предположение.

Ограничением данного исследования является то, что оценка состояния различных звеньев иммунитета у пациентов проведена в период первого обострения ХОБЛ с момента постановки диагноза. Возможно, некоторые обнаруженные нами особенности иммунного статуса у обследованных больных могли быть связаны с активацией инфекционного процесса в период обострения и иметь транзиторный характер. Требуется продолжение исследований вне обострения ХОБЛ. Не исключено, что результаты исследования состояния иммунной системы больных ХОБЛ в период ремиссии ярче высветят иммунопатологические механизмы ХОБЛ, в том числе те, которые являются решающими для неблагоприятного исхода заболевания.

Выводы. Неблагоприятный исход ХОБЛ связан с увеличением числа нейтрофильных клеток в БАЖ, крови, преобладанием активации Th1-клеточно-опосредованного компонента адаптивного иммунитета на местном уровне и активацией как клеточного, так и гуморального механизмов адаптивного иммунитета на системном уровне. Усиление активности врожденного иммунитета при обострении ХОБЛ, проявляющееся увеличением числа макрофагов и их метаболической активности, ассоциировано с долговременной выживаемостью больных (15 и более лет).

Прозрачность исследования. Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях. Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за исследование.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, López-Campos JL, Ancochea J, Coebergh JW, Soriano JB. International trends in COPD mortality, 1995-2017. *Eur Respir J.* 2019; 54 (6): 1901791. DOI: 10.1183/13993003.01791-2019.
2. Rabe KF, Watz H. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2017; 389 (10082): 1931-1940. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31222-9.
3. Tam A, Tanabe N, Churg A, Wright JL, Hogg JC, Sin DD. Sex differences in lymphoid follicles in COPD airways. *Respir Res.* 2020; 21 (1): 46. DOI: 10.1186/s12931-020-1311-8.
4. Bai JW, Chen XX, Liu S, Yu L, Xu JF. Smoking cessation affects the natural history of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2017; 12: 3323-3328. DOI:10.2147/COPD.S150243.
5. Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, O'Shaughnessy T, Ram FS, Qiu Y, Zhu J, Vignola AM, Kroegel C, Morell F, Pavord ID, Rabe KF, Jeffery PK, Barnes NC. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J.* 2007; 30 (3): 467-471. DOI: 10.1183/09031936.00013006.
6. MacLeod M, Papi A, Contoli M, Beghé B, Celli BR, Wedzicha JA, Fabbri LM. Chronic obstructive pulmonary disease exacerbation fundamentals: Diagnosis, treatment, prevention and disease impact. *Respirology.* 2021; 26 (6): 532-551. DOI: 10.1111/resp.14041.
7. Waeijen-Smit K, Houben-Wilke S, DiGian-domenico A, Gehrman U, Franssen FME. Unmet needs in the management of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Intern Emerg Med.* 2021; 16 (3): 559-569. DOI: 10.1007/s11739-020-02612-9.
8. Whittaker Brown SA, Braman S. Recent Advances in the Management of Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Med Clin North Am.* 2020; 104 (4): 615-630. DOI: 10.1016/j.mcna.2020.02.003.
9. Celli BR, Decramer M, Wedzicha JA, Wilson KC, Agustí A, Criner GJ, MacNee W, Make BJ, Rennard SI, Stockley RA, Vogelmeier C, Anzueto A, Au DH, Barnes PJ, Burgel PR, Calverley PM, Casanova C, Clini EM, Cooper CB, Coxson HO, Dusser DJ, Fabbri LM, Fahy B, Ferguson GT, Fisher A, Fletcher MJ, Hayot M, Hurst JR, Jones PW, Mahler DA, Maltais F, Mannino DM, Martinez FJ, Miravittles M, Meek PM, Papi A, Rabe KF, Roche N, Sciruba FC, Sethi S, Siafakas N, Sin DD, Soriano JB, Stoller JK, Tashkin DP, Troosters T, Verleden GM, Verschakelen J, Vestbo J, Walsh JW, Washko GR, Wise RA, Wouters EF, ZuWallack RL. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Research questions in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 191 (7): e4-e27. DOI: 10.1164/rccm.201501-0044ST.
10. Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, Donithan MG. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann Intern Med.* 1987; 106 (4): 512-518. DOI: 10.7326/0003-4819-106-4-512.
11. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований) / под ред. проф. В.С.Камышникова. – 2-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2017. – 720 с. [Kamyshnikov VS, ed. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (metody i traktovka laboratornyh issledovaniy)* [Clinical laboratory diagnostics (methods and interpretation of laboratory research)]. Moskva: MEDpress-inform [Moscow: MEDpress-inform]. 2017; 2: 720 p. (In Russ.)].
12. Карзакова Л.М., Кудряшов С.И., Луткова Т.С. [и др.]. Основы общей иммунологии: учеб. пособие / Чебоксары: Издательство Чувашского университета, 2020. – 200 с. [Karzakova LM, Kudryashov SI, Lutkova T.S, Sokolova EV, Sidorov IA. *Osnovy obshchej immunologii: uchebnoe posobie* [Fundamentals of general immunology: textbook]. Cheboksary: Izdatel'stvo Chuvashskogo universiteta [Cheboksary: Chuvash University Press]. 2020; 200 p. (In Russ.)].
13. Раков А.Л., Панфилов Д.Н., Гельцер Б.И. Местный клеточный и гуморальный иммунитет у больных острым бронхитом / Военно-медицинский журнал. – 2001. – № 2. – С.44-49. [Rakov AL, Panfilov DN, Gel'cer BI. *Mestnyj kletochnyj i gumoral'nyj иммунитет u bol'nyh*

- ostrym bronhitom [Local cellular and humoral immunity in patients with acute bronchitis]. *Voenno-meditsinskij zhurnal [Military Medical Journal.]*. 2001; 2: 44-49. (In Russ.).
14. Schildge J, Klar B, Hardung-Backes M. Die Mastzelle in der bronchoalveolären Lavage bei interstitiellen Lungenerkrankungen [Mast cells in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases]. *Pneumologie*. 2003; 57 (4): 202-207. DOI: 10.1055/s-2003-38569.
 15. Bastian A, Tunkel C, Lins M, Böttcher H, Hirt SW, Cremer J, Bewig B. Immunoglobulin A and secretory immunoglobulin A in the bronchoalveolar lavage from patients after lung transplantation. *Clin Transplant*. 2000;14(6):580-5. DOI: 10.1034/j.1399-0012.2000.140611.x.
 16. Мурашов Э.Г., Столов С.В., Тотолян А.А. Цитокиновый профиль бронхоальвеолярной жидкости у больных бронхиальной астмой / Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2012. – Т. 4, №1. – С. 67-72. [Murashov EG, Stolov SV, Totolyan AA. Cytokinovyj profil' bronhoal'veolyarnoj zhidkosti u bol'nyh bronhial'noj astmoj [Cytokine profile of bronchoalveolar fluid in patients with bronchial asthma]. *Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta imeni I Mechnikova [Bulletin of the I Mechnikov Northwestern State Medical University]*. 2012; 4 (1): 67-72. (In Russ.).]
 17. Forsslund H, Yang M, Mikko M, Karimi R, Nyrén S, Engvall B, Grunewald J, Merikallio H, Kaarteenaho R, Wahlström J, Wheelock ÅM, Sköld CM. Gender differences in the T-cell profiles of the airways in COPD patients associated with clinical phenotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016; 12: 35-48. DOI: 10.2147/COPD.S113625.
 18. Byun MK, Cho EN, Chang J, Ahn CM, Kim HJ. Sarcopenia correlates with systemic inflammation in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017; 12: 669-675. DOI: 10.2147/COPD.S130790.
 19. Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2012; 122 (8): 2749-2755. DOI: 10.1172/JCI60324.
 20. Cheng G, Zhang N, Wang Y, Rui J, Yin X, Cui T. Antibodies of IgG, IgA and IgM against Human Bronchial Epithelial Cell in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Lab*. 2016; 62 (6): 1101-1108. DOI: 10.7754/clinlab.2015.151020.
 21. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson HO, Cogswell S, Storness-Bliss C, Corry DB, Kheradmand F. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med*. 2007; 13 (5): 567-569. DOI: 10.1038/nm1583.
 22. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules*. 2019; 9 (8): 365. DOI: 10.3390/biom9080365.
 23. Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*. 2019; 133 (20): 2178-2185. DOI: 10.1182/blood-2018-11-844530.
 24. Dicker AJ, Crichton ML, Pumphrey EG, Cassidy AJ, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Furrie E, Fong CJ, Ibrahim W, Brady G, Einarsson GG, Elborn JS, Schembri S, Marshall SE, Palmer CNA, Chalmers JD. Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2018; 141 (1): 117-127. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.04.022.
 25. Ma A, Wen L, Yin J, Hu Y, Yue X, Li J, Dong X, Gupta Y, Ludwig RJ, Krauss-Etschmann S, Riemekasten G, Petersen F, Yu X. Serum Levels of Autoantibodies Against Extracellular Antigens and Neutrophil Granule Proteins Increase in Patients with COPD Compared to Non-COPD Smokers. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2020; 15: 189-200. DOI: 10.2147/COPD.S235903.