

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-003.244(577.152.193+577.152.344)616.248:612.225

КЛЕТОЧНЫЙ ПРОФИЛЬ ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЫ, УРОВЕНЬ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ И НЕЙТРОФИЛЬНОЙ ЭЛАСТАЗЫ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬЮ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ НА ГИПООСМОЛЯРНЫЙ СТИМУЛ

А.Б.Пирогов¹, А.Г.Приходько¹, Ю.М.Перельман¹, С.В.Зиновьев²,
Е.В.Ушакова¹, Г.А.Макарова¹, Д.Е.Наумов¹

¹Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

²Амурская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ,
675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95

РЕЗЮМЕ

Целью исследования явилось изучение взаимоотношения клеток воспаления бронхов с активностью миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы у больных бронхиальной астмой (БА) с гиперреактивностью дыхательных путей на гипосмолярный стимул. У 54 больных персистирующей БА проведено цитологическое исследование индуцированной мокроты с цитохимическим выявлением активности миелопероксидазы лейкоцитов и количественное определение содержания в сыворотке крови нейтрофильной эластазы, альфа-1-антитрипсина и миелопероксидазы. По результатам реакции на ультразвуковую ингаляцию дистиллированной воды больные были объединены в группы: с гиперреактивностью дыхательных путей на осмотический стимул (1 группа, 19 пациентов) и с отсутствием реакции на бронхопровокацию (2 группа, 35 больных). Группу контроля составили 15 здоровых лиц. В мокроте пациентов обеих групп по отношению к контролю наблюдалось увеличение содержания лейкоцитов, с преобладанием прироста нейтрофилов и наиболее высокой концентрацией миелопероксидазы внутри лейкоцитов в мокроте больных 1 группы. Уровень нейтрофильной эластазы и миелопероксидазы сыворотки крови снижался после ингаляции дистиллированной водой: минимально в 1 группе и статистически достоверно во 2 группе, что связано

с расходом ферментов и нейтрализацией их активности ингибиторами. Показано участие нейтрофильных лейкоцитов и смешанного эозинофильно-нейтрофильного паттерна бронхиального воспаления в формировании гиперреактивности дыхательных путей к гипосмолярному стимулу, поддержании оксидативного стресса и персистирующего воспаления в дыхательной системе.

Ключевые слова: гиперреактивность бронхов, гипосмолярность, эозинофильно-нейтрофильный паттерн воспаления, нейтрофилы, миелопероксидаза, нейтрофильная эластаза.

SUMMARY

CELLULAR PROFILE OF THE INDUCED SPUTUM, THE LEVEL OF MYELOPEROXIDASE AND NEUTROPHILIC BLOOD ELASTASE IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA WITH AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS TO HYPOSMOLAR STIMULUS

A.B.Pirogov¹, A.G.Prikhodko¹, J.M.Perelman¹,
S.V.Zinov'ev², E.V.Ushakova¹, G.A.Makarova¹,
D.E.Naumov¹

¹Far Eastern Scientific Center of Physiology and
Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str.,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

²Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str.,
Blagoveshchensk, 67500, Russian Federation

The aim of the research is to study the correlation of cells of bronchial inflammation with the activity of myeloperoxidase and neutrophilic elastase in asthmatics with airway hyperresponsiveness to hyposmolar stimulus. In 54 patients with persistent asthma cytological study of induced sputum with cytochemical identification of activity of leucocytes myeloperoxidase and the quantitative identification of the contents of neutrophilic elastase, alpha-1-antitrypsin and myeloperoxidase in the blood serum was done. By the results of the response to ultrasonically nebulized distilled water inhalation the patients were divided in the groups: the one with airway hyperresponsiveness to osmotic stimulus (the 1st group, 19 patients) and the one without any response to bronchial provocation (the 2nd group, 35 patients). The group of control included 15 healthy people. In the sputum of the patients of both groups in comparison with the control there was an increase of leucocytes contents with the domination of neutrophils growth and high concentration of myeloperoxidase inside leucocytes in the sputum of the patients of the 1st group. The level of neutrophilic elastase and myeloperoxidase of the blood serum decreased after distilled water inhalation: minimally in the 1st group and significantly in the 2nd group, which was caused by enzymes exhaustion and neutralization of their activity by inhibitors. The participation of neutrophilic leucocytes and mixed eosinophilic-neutrophilic pattern of bronchial inflammation in the formation of airway hyperresponsiveness to hyposmolar stimulus, keeping oxidative stress and persisting inflammation in the respiratory system was shown.

Key words: bronchial hyperresponsiveness, hyposmolarity, eosinophilic-neutrophilic pattern of bronchial inflammation, neutrophils, myeloperoxidase, neutrophilic elastase.

В современных исследованиях воспаление рассматривается в качестве центрального фактора патогенеза и клинических проявлений бронхиальной астмы (БА), приводящего к обструкции и гиперреактивности дыхательных путей, при этом подчеркивается полиморфизм клеточного спектра воспаления и необходимость активного изучения его нейтрофильного компонента [9]. Считается, что активации нейтрофилов в процессе воспаления предшествует предварительная обработка агентами (цитокинами, хемотаксическими факторами, метаболическими регуляторами), действующими через принадлежащие разным семействам рецепторы и приводящими клетки в состояние готовности к последующему ответу на активацию, — так называемое праймирование (от англ. «priming» — подготовка) [3]. Сами праймирующие агенты не вызывают изменений функций нейтрофилов, в том числе респираторного взрыва, но их предварительное воздействие приводит к усилению ответа на активацию. В зависимости от рецептора, через который действует праймирующий агент, могут реализоваться разные механизмы праймирования нейтрофилов: изменения в уровне экспрессии адгезивных молекул на поверхности клетки; освобож-

дение содержимого гранул, полимеризация актина; фосфорилирование; синтез белка de novo. При праймировании активность различных протеинкиназ, в том числе MAPKs и тирозиновых киназ, может увеличиваться в несколько раз [3]. Нельзя исключить, что в климатические сезоны с повышенной влажностью воздуха, резкой сменой погодных условий, периодами прохождения атмосферных фронтов, что является достаточно актуальным для регионов Дальнего Востока, подобную роль может играть нарушение осморного гомеостаза дыхательной системы, провоцирующее развитие бронхоспастического синдрома и неконтролируемого течения болезни у больных БА [11].

В основе нарушения осморного гомеостаза бронхов и чрезмерной бронхиальной реакции на гипоосморный стимул лежит эскалация оксидативного стресса, увеличивающего проницаемость биологических мембран, стимулирующего дисбаланс осморности клеток, межклеточного пространства и активацию осмочувствительных нейронов [5]. Нарушение осморности способно запускать каскад молекулярных реакций, усиливая активность клеточного воспаления либо ускоряя происходящие процессы [5]. Возможно, что праймирующий осморный фактор приводит к усилению респираторного взрыва нейтрофилов воспалительного инфильтрата бронхов у больных БА и определяет особенности их функционального ответа на воздействие гипоосморного стимула.

Роль нейтрофилов в реализации оксидативного стресса и регуляции воспаления связана, в частности, с такими ферментами, как миелопероксидаза (МПО) и нейтрофильная эластаза (НЭ), депонирующимися в азурофильных гранулах клеток и секретируемыми во внеклеточное пространство путем дегрануляции. Оксидо-редуктаза МПО катализирует образование чрезвычайно реакционноспособных галогенсодержащих соединений, участвующих в окислительной модификации белков, липидов, углеводов, ДНК и других биологически важных молекул [4, 15, 16] и, наряду с активными формами кислорода и азота, обуславливает эффективность клеточного ответа в индукции и поддержании воспаления [14]. Высоко реакционноспособные оксиданты — гипогалоидные кислоты, образующиеся в системе H_2O_2 –МПО, и их производные — вторичные активные формы галогенов — посредством эффективного вступления в реакции присоединения, замещения, галогенирования являются, таким образом, связующим звеном между оксидативным и галогенирующим стрессом [4, 15, 16]. Основным источником активных форм кислорода и галогенов служат праймированные нейтрофильные лейкоциты [3], депонирующие МПО в азурофильных гранулах и секретирующие фермент в межклеточную среду путем дегрануляции, стимулированной медиаторами воспаления [14]. Сериновая протеаза НЭ, обладающая высокими протеолитическими свойствами, участвует в деградации матриксных белков — эластина, коллагена, фибронектина, ламинина, протеогликанов,

расщепляет многие растворимые протеины, такие, как сурфактантный протеин-А, иммуноглобулины, факторы коагуляции, компоненты комплемента, лизирует некоторые цитокины воспаления (IL-1 β , 2, 6, фактор некроза опухоли- α), одновременно способствуя продукции IL-6, IL-8, колониестимулирующего фактора [1, 9]. В результате клинических исследований установлено, что НЭ служит маркером нейтрофильного воспаления, присутствующим, наряду с эозинофильным, у пациентов с atopической БА среднетяжелого и тяжелого персистирующего течения [9]. При тяжелой терапевтически резистентной БА brittle-фенотипа (эозинофильный паттерн воспаления) и при БА с фиксированной обструкцией бронхов (нейтрофильный паттерн воспаления) отмечено повышение функционирования НЭ на фоне повышения в первом случае и снижения во втором активности α -протеиназного ингибитора [2]. Аналогичные данные были обнаружены нами в отношении МПО, являющейся маркером хронического воспаления бронхов у больных БА с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей, паттерн воспаления которых охарактеризован как смешанный, нейтрофильно-эозинофильный [6]. В цитоплазме нейтрофилов мокроты таких больных определялась пониженная активность МПО, обусловленная интенсивной дегрануляцией и экзоцитозом ферментсодержащих гранул в экстрацеллюлярное пространство, что свидетельствовало о значении активности внеклеточной МПО в обеспечении воспаления и реактивной бронхоконстрикции [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимоотношения клеток воспаления бронхов с активностью МПО и НЭ у больных БА с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 66 пациентов с персистирующей БА, смешанной формы, легкого и среднетяжелого частично контролируемого течения, в соответствии с критериями GINA (2014).

Критерии включения: пациенты обоего пола в возрасте от 18 лет до 55 лет, отсутствие острых респираторных заболеваний и обострений сопутствующих хронических заболеваний в течение предыдущего месяца, систематическая базисная терапия ингаляционными глюкокортикостероидами в дозе ≤ 1000 мкг (в перерасчете на бекламетазон) не менее 12 недель на момент включения в исследование. Пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания. Группу контроля составили 15 здоровых лиц.

Дизайн работы предполагал: анализ клинических симптомов астмы; оценку уровня контроля астмы по данным вопросника Asthma Control Test, оценку вентилиционной функции легких с анализом параметров кривой «поток–объем» форсированного выдоха при

спирометрии на аппарате FlowScreen (Erich Jaeger, Германия), сбор индуцированной мокроты, тестирование больных для оценки реакции дыхательных путей на гипоосмолярный стимул. С этой целью всем пациентам проводилась стандартная 3-минутная бронхопровокационная проба с ультразвуковой ингаляцией дистиллированной воды (ИДВ), перед и после которой осуществлялся забор крови для биохимического исследования. Осмотическую гиперреактивность дыхательных путей диагностировали при падении объема форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁) более чем на 10% от исходной величины показателя [7].

Перед сбором индуцированной мокроты (ИМ) выполнялась спирометрия, затем больному через дозированный аэрозольный ингалятор вводился сальбутамол в дозе 200 мкг. Индукция мокроты проводилась путем последовательной ингаляции 3%- , 4%- и 5%-го раствора хлорида натрия через ультразвуковой небулайзер (OMRON NE-U-17, Япония) сеансами по 5 минут, по завершении каждого сеанса определяли ОФВ₁. При снижении ОФВ₁ более 10% от исходного значения и получении удовлетворительного образца мокроты ингаляцию прекращали. ИМ исследовали по общепринятой методике [13] не позднее 2 часов после её получения.

Микропрепараты ИМ изучали при помощи светоптической иммерсионной микроскопии, с подсчетом не менее 400 клеток в 100 полях зрения. Подсчитанное количество клеток выражали в процентах. Цитохимическое исследование активности МПО нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов в цитологических мазках ИМ проводилось с помощью метода Грэхема-Кнолля [10] с докраской мазков после обработки бензидином и перекисью водорода водным раствором азура-2. Изображения микропрепаратов переводили в цифровую форму с помощью аналоговой видеокамеры ДСМ 510 и системы захвата изображения. Для цифровой обработки изображений клеток использовали компьютерные программы Image Tool и Optika Vision Pro (Италия), Mac Biophotonics Image S (США), с учетом полученных данных оптической плотности фермента рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) МПО (в пикселях).

Количество МПО в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа на полуавтоматическом иммуно-ферментном анализаторе Multiskan Fc (Termo Fisher Scientific, Финляндия) с использованием коммерческого набора Bender Med-Systems (кат. № BMS2038). Перед началом исследования образцы разводили 1:50 разбавителем образцов. МПО образцов, стандартов и контрольных образцов связывались со специфичными к МПО антителами, сорбированными в лунках микропланшета. После ряда инкубаций с реагентами для амплификации и промывки в лунки добавляли субстратный раствор, который взаимодействовал с пероксидазой хрена с образованием окрашенного раствора. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 450 нм. Концент-

рацию МПО в полученных образцах сравнивали со стандартной кривой, построенной по 7 разведениям стандарта. Минимально определяемая концентрация МПО (чувствительность набора) составляла 0,026 пг/мл.

Исследование НЭ в сыворотке крови проводили при помощи твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Multiskan Fc (Termo Fisher Scientific, Финляндия) с использованием коммерческого набора Bender MedSystems для определения полиморфноядерной эластазы (кат. № BMS269). Поликлональные антитела, специфичные к НЭ, были адсорбированы в ячейках микропланшета. НЭ образцов, стандартов и контрольными образцов связывалась с антителами, адсорбированными в ячейках. Во время второй инкубации добавлялся конъюгат поликлональных антител к α 1-PI с пероксидазой хрена, который связывал молекулы НЭ, захваченные первыми антителами. После инкубации и промывки из ячеек удалялся не связавшийся ферментный конъюгат, в ячейки добавлялся субстратный раствор, который взаимодействовал с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора. Реакция останавливалась добавлением кислоты. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 450 нм. Концентрацию НЭ в образцах сравнивали со стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта НЭ. Минимально определяемая концентрация НЭ (чувствительность набора) составляла 3 нг/мл.

Количественное определение α -1 антитрипсина (ААТ) в сыворотке крови выполнялось иммунотурбидиметрическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе Ease Ra (Medica, США) с использованием коммерческого набора (SENTINEL, Италия, кат. № 11012 N). Перед началом исследования образцы разводили 0,95 NaCl в отношении 1:21 (1v + 20v). Затем, в образцы добавляли последовательно реагент №1 (фосфатный буфер, pH = 7,5 20 ммоль/л, ПЭГ $\geq$ 5%, хлорид натрия 150 ммоль/л, азид натрия $<$ 0,1%) и реагент №2 (поликлональные антитела к α -1 антитрипсину, азид натрия $<$ 0,1%). Параметр измерялся по приросту оптической плотности при длине волны 340 (334-365) нм. Нижний предел определения (чувствительность набора) 10 мг/дл.

Статистический анализ полученного материала проводился на основе стандартных методов вариационной статистики. Для определения достоверности

различий использовали параметрический критерий (t) Стьюдента (парный, непарный), в случаях негауссовых распределений – непараметрический критерий Уилкоксона. С целью определения степени связи между двумя случайными величинами проводили корреляционный анализ, рассчитывали коэффициент корреляции (r). Для всех величин принимались во внимание уровни значимости $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам реакции на ультразвуковую ИДВ больные были объединены в группы: с гиперреактивностью дыхательных путей на осмотический стимул (1 группа, 15 человек) и с отсутствием реакции на бронхопровокацию (2 группа, 20 больных), Δ ОФВ₁ (-15,1 $\pm$ 2,3%) и -3,0 $\pm$ 0,62%; $p < 0,001$, соответственно.

В 1 группе по сравнению со 2 группой исходно отмечались более выраженные нарушения бронхиальной проходимости, тестируемые по ОФВ₁ (89,6 $\pm$ 2,87% и 95,6 $\pm$ 2,23%; $p < 0,05$, соответственно) и по максимальной скорости форсированного выдоха при на уровне 25-75% форсированной жизненной емкости легких (МОС₂₅₋₇₅ 56,1 $\pm$ 3,6 и 70,9 $\pm$ 4,3; $p < 0,05$, соответственно).

При анализе клеточного состава ИМ зарегистрировано достоверно более высокое содержание нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов у больных БА по сравнению с контролем с преобладанием прироста нейтрофилов в 1 группе (табл. 1), сочетающегося с выраженным снижением числа макрофагов и более чем двукратным по сравнению со 2 группой повышением степени десквамации бронхиального эпителия. Повышенное количество лейкоцитов в ИМ обусловлено их мобилизацией из кровеносного русла в очаг воспаления, при этом значительная доля нейтрофилов в ИМ пациентов 1 группы свидетельствует о тенденции сдвига эозинофильного воспалительного паттерна, присущего аллергическому фенотипу астмы, в сторону смешанного эозинофильно-нейтрофильного.

Характер функциональных ответов бронхиальных лейкоцитов, в частности нейтрофилов, оценивался по содержанию МПО и НЭ в сыворотке крови. Исходный уровень МПО и НЭ перед проведением пробы ИДВ в обеих группах больных был достоверно выше, чем у здоровых лиц (табл. 2), но существенно не различался между лицами с положительной и отрицательной реакцией на стимул.

Таблица 1

Клеточный состав (в %) индуцированной мокроты (M $\pm$ m)

Группы	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты	Эпителий
1 группа	31,2 $\pm$ 3,4***	25,3 $\pm$ 3,6***	35,2 $\pm$ 4,1***	3,7 $\pm$ 0,5*	2,7 $\pm$ 0,4***
2 группа	28,6 $\pm$ 3,3***	24,7 $\pm$ 3,7***	41,5 $\pm$ 5,1**	3,0 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,6; $p < 0,05$
Контроль	11,6 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,1	84,8 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2

Примечание: Здесь и далее звёздочкой отмечена достоверность отличий по сравнению с контрольной группой (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$); p – значимость различий показателей между 1 и 2 группами.

Таблица 2

Уровень миелопероксидазы (МПО), нейтрофильной эластазы (НЭ) и α -1-антитрипсина (ААТ) в сыворотке крови до и после пробы ИДВ ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	1 группа	2 группа	p
МПО, нг/мл	61,5 $\pm$ 12,2	$\frac{149,4 \pm 30,5^{***}}{143,4 \pm 34,4}$	$\frac{177,7 \pm 23,2^{**}}{125,6 \pm 30,7; p_1 < 0,001}$	$\frac{p > 0,05}{p < 0,05}$
НЭ, нг/мл	164,3 $\pm$ 33,0	$\frac{273,4 \pm 67,9}{249,1 \pm 58,4}$	$\frac{320,0 \pm 52,1}{180,6 \pm 33,3; p_1 < 0,01}$	$\frac{p > 0,05}{p < 0,05}$
ААТ, мг/дл	158,3 $\pm$ 7,1	$\frac{206,6 \pm 12,4^{***}}{197,7 \pm 10,4}$	$\frac{210,2 \pm 7,9^{***}}{197,2 \pm 7,0}$	$\frac{p > 0,05}{p > 0,05}$

Примечание: в числителе значения показателей до пробы ИДВ, в знаменателе – значения показателей после пробы ИДВ; p_1 – достоверность различий в сравнении с исходными значениями показателя.

После проведения ИДВ концентрация исследуемых ферментов в крови больных уменьшалась, с минимальными признаками снижения в 1 группе и статистически достоверным падением во 2 группе. Аналогичная динамика прослеживалась и в отношении ААТ, однако уменьшение этого показателя в обеих группах было незначительным. Как можно предположить, снижение уровня МПО и НЭ связано с усиленной утилизацией ферментов в ситуации, стимулирующей образование активных форм галогенов, протеолитическую активность и воспаление в тканях бронхов. В случае с НЭ речь идёт и о потреблении достаточного количества ААТ, при этом остаётся неясным, обеспечивается ли необходимый баланс в системе протеолиз-антипротеолиз в условиях бронхопровокации, по-видимому, оказывающей стимулирующее влияние на активацию нейтрофильного компонента воспаления, ферментативный синтез в нейтрофилах и экзоцитоз ферментсодержащих гранул в экстрацеллюлярную среду. Скорее всего, продукция ААТ у больных является недостаточной, если исходить из утверждения, что ААТ поступает в бронхиальное дерево как путем пассивной диффузии из плазмы, так и секретруется местно гистиомакрофагальными элементами [2, 12], количество которых в ИМ исследуемых групп достоверно более низкое, чем в контроле, причём наиболее существенное снижение количества макрофагов установлено в мокроте больных 1 группы (табл. 1).

Анализ полученных показателей содержания исследуемых ферментов в крови больных в результате изменения осмолярности в респираторном тракте обнаруживает признаки более выраженной нейтрализации МПО и НЭ во 2 группе по сравнению с 1 группой. Можно предположить, что адекватная регуляция воспалительной активности ферментов осуществляется только во 2 группе. В 1 группе значения концентрации МПО и НЭ остаются достаточно высокими и, в отличие от 2 группы, достоверно не изменяются после бронхопровокации. Значения МПО и НЭ в крови пациентов 1 группы после проведенной пробы с ИДВ, практически равнозначны исходному уровню, свидетельствуя о возможных значительных дефектах в деятельности ингибиторов ферментов – антипротеазной активности ААТ или функциональных свойствах регуляторов активности МПО, находящихся во внеклеточ-

ном пространстве. В плазме крови к последним принадлежит церулоплазмин – ингибитор хлорирующей и пероксидазной активности МПО, который, наряду с глутатионом, таурином, аскорбатом, уратом, представляет собой эффективный перехватчик активных форм галогенов, триптофана. Немаловажная роль в ингибировании катализируемого МПО окисления галогенидов отводится и нормализации pH биологических тканей [4]. Что касается антипротеазной активности, то, как отмечено А.В.Аверьяновым и А.Э.Поливановой [1], несмотря на значительные антипротеазные резервы (кроме случаев дефицита ААТ), имеющиеся в любом организме, существуют механизмы, помогающие нейтрофилам реализовать свой деструктивный потенциал. В работе указанных авторов приводятся сведения о том, что, во-первых, нейтрофилы способны создавать вокруг себя так называемое рабочее защищенное пространство, недоступное для ингибиторов. Во-вторых, нейтрофилы выделяют оксиданты, окисляющие активный центр ААТ, делая его функционально неактивным. В-третьих, связавшись с эластином экстрацеллюлярного матрикса, НЭ становится неуязвимой для серпинов (серпин α -1 является геном α -антитрипсина) [1].

Воспаление бронхов у больных БА 1 группы можно охарактеризовать как персистирующее, за поддержание которого ответственна, в том числе, и активация нейтрофильных лейкоцитов. По всей вероятности, чрезмерная реакция бронхов на гипоосмолярный стимул обеспечивает непрерывную стимуляцию нейтрофилов и повышенный уровень их функциональной активности, к проявлениям которой относятся дегрануляция и выброс ферментов в межклеточную среду. В отношении МПО чрезмерная активация нейтрофилов сопряжена с индукцией внутриклеточного респираторного взрыва и сдвигом окислительно-восстановительного статуса не только бронхолегочного региона, но и крови, в сторону прооксидантов. Избыточная продукция НЭ связана с ростом эластолитической активности в воспалительно измененных бронхах, перспективой усугубления деструкции, бокаловидно-клеточной гиперплазии и атрофии эпителиального пласта, развития пролиферативно-фибропластических процессов в соединительной ткани, ремоделирования бронхов, про-

грессирования бронхиальной гиперреактивности и неконтролируемого течения астмы [2]. Установлено, что НЭ стимулирует бокаловидноклеточную гиперплазию, что подтверждается выявленной в клинко-морфологических исследованиях положительной корреляцией между активностью эластазы и объемной плотностью бокаловидных эпителиоцитов. Высказано предположение о том, что совокупность реакций протеолиза и нарастающей фиброплазии приводят в этом случае к развитию нестабильной формы БА с формированием выраженного бронхообструктивного синдрома [2].

Следует отметить, что параметры, характеризующие функционирование нейтрофильного клеточного компонента бронхиального инфильтрата, а именно уровни МПО и НЭ в крови больных БА как с наличием, так и с отсутствием реакции дыхательных путей на гипоосмолярный стимул, отражают системный уровень нарушения гомеостаза и могут быть расценены как маркеры системного оксидативного стресса и воспаления. Нами не выявлено статистически достоверных различий между показателями МПО, НЭ и ААТ в двух исследуемых группах. Для того чтобы создать полную картину взаимосвязи системного и локального уровней поражения организма болезнью, в данном случае БА с осмотической бронхиальной гиперреактивностью, необходимо сопоставление параметров содержания нейтрофильных ферментов в крови и непосредственно в гранулоцитах бронхиального инфильтрата. При исследовании СЦК МПО в цитоплазме лейкоцитов ИМ больных БА было найдено достоверное увеличение оптической плотности фермента в группе больных с реакцией бронхов на ИДВ ($113,7 \pm 10,15$ пикселей) по отношению к группе контроля ($84,8 \pm 4,06$ пикселей; $p < 0,05$) и тенденция к большему насыщению ферментом азурофильных гранул лейкоцитов по сравнению с группой больных, не имевших реакции на ИДВ ($98,2 \pm 14,64$ пикселей). В свою очередь, у этих больных базовый уровень СЦК МПО в ИМ был тесно связан с содержанием НЭ до и после пробы ИДВ ($r = 0,76$, $p < 0,05$; $r = 0,70$, $p < 0,05$). Существует мнение [8], что высокое содержание внутриклеточной НЭ в ИМ больных эндогенной неаллергической астмой не сопровождается изменением уровня НЭ в крови, что указывает на возможность ограничения патологического процесса в пределах дыхательной системы.

Таким образом, морфофункциональный статус бронхиального воспаления у больных БА с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул включает в себя нейтрофильный компонент, проявляющийся увеличением доли нейтрофильных лейкоцитов в клеточном составе ИМ, высоким содержанием МПО в цитоплазме лейкоцитов ИМ и стабильными (до и после проведения ИДВ) уровнями МПО и НЭ крови. Роль праймирующих факторов, предшествующих респираторному взрыву нейтрофилов, повреждению тканей бронхов гипогалогенитами, образующимися в результате каталитической деятельности МПО, и эластолизу, как результату избыточной

продукции НЭ, может быть отведена изменению осмотического градиента бронхов. Нейтрофильный компонент клеточного спектра воспаления логично рассматривать как маркер гиперреактивности бронхов в условиях нарушения осмолярности внутрибронхиальной среды у высокочувствительных к гипотоническому раствору больных. В клинической практике уровни активности МПО и НЭ, связанные с активацией нейтрофильного воспаления в патогенезе бронхообструкции, обладают прогностической значимостью и являются ориентирами для оценки эффективности проводимой противовоспалительной терапии. С фундаментальных позиций патофизиологическое значение нейтрофильных лейкоцитов в бронхиальном инфильтрате заключается в поддержании персистирующего воспаления и эскалации оксидативного стресса в дыхательной системе, лежащими в основе чрезмерной реакции бронхов больных БА к осмотическому стимулу.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №14-25-00019).

ЛИТЕРАТУРА

1. Аверьянов А.В., Поливанова А.Э. Нейтрофильная эластаза и болезни органов дыхания // Пульмонология. 2006. №5. С.74–79.
2. Роль клеточных и молекулярных мишеней в формировании различных паттернов воспаления при гетерогенных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы / Е.А.Геренг, И.В.Суходоло, Л.М.Огородова, Р.И.Плешко, Л.И.Волкова, О.В.Козина, П.А.Селиванова, А.Н.Дзюман, О.Е.Акбашева // Пульмонология. 2009. №5. С.78–82.
3. Миллер А.В. Механизмы праймирования респираторного взрыва нейтрофилов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Пущино, 2004. 20 с.
4. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Галогенирующий стресс и его биомаркеры // Вестник Российской АМН. 2010. №1. С.27–39.
5. Роль оксидативного стресса в реакции дыхательных путей на гипоосмолярный стимул у больных бронхиальной астмой / Ю.М.Перельман, А.Г.Приходько, Е.А.Бородин, Е.В.Ушакова // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып.54. С.17–22.
6. Активность миелопероксидазы нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов индуцированной мокроты у больных бронхиальной астмой с холодовой бронхиальной гиперреактивностью / А.Б.Пирогов, С.В.Зиновьев, Ю.М.Перельман, Ю.О.Семиреч, Г.В.Семенова, А.В.Колосов // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып.53. С.50–56.
7. Приходько А.Г. Реакция дыхательных путей на гипоосмолярный стимул // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2005. Вып.21. С.47–52.
8. Собченко С.А., Бейда Е.В., Кравцов В.Ю. Клинико-лабораторные особенности поздней астмы в периоде стабильного течения // Рос. семейный врач. 2006. Т.4, №10. С.31–33.
9. Активность нейтрофильной эластазы сыворотки

крови у больных атопической бронхиальной астмой / Д.С.Фомина, Л.А.Горячкина, Н.М.Ненасьева, Е.А.Нешкова // Пульмонология. 2010. №2. С.82–86.

10. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия: пер. с англ. / под ред. Н.С.Кисляк. М.: Медицина, 1983. 318 с.

11. Хижняк Ю.Ю., Перельман Ю.М., Колосов В.П. Сезонная динамика проходимости и реактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой в условиях муссонного климата // Тихоокеанский мед. журн. 2009. №1. С. 82–84.

12. Endothelial alpha-1-antitrypsin attenuates cigarette smoke induced apoptosis in vitro / R.Aldonyte [et al.] // Eur. Respir. J. 2008. Vol.5, №3. P.153–162.

13. Induced sputum in asthma: from bench to bedside / P.Bakakos [et al.] // Curr. Med. Chem. 2011. Vol.18, №10. P.1415–1422.

14. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe // J. Leukoc. Biol. 2005. Vol.77, №5. P.598–625.

15. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid / E.Malle [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. 2006. Vol. 1761, №4. P.392–415.

16. Pattison D.I., Davies M.J. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases // Cur. Med. Chem. 2006. Vol.13, №27. P.3271–3290.

REFERENCES

1. Aver'yanov A.V., Polivanova A.E. *Pul'monologiya* 2006; 5:74–79 (in russian).

2. Gereng E.A., Sukhodolo I.V., Ogorodova L.M., Pleshko R.I., Volkova L.I., Kozina O.V., Selivanova P.A., Dzyuman A.N., Akbasheva O.E. *Pul'monologiya* 2009; 5:78–82 (in russian).

3. Miller A.V. The mechanisms of priming of the respiratory burst of neutrophils: abstract of PhD thesis (Med. Sci.). Pushchino; 2004 (in russian).

4. Panasenkov O.M., Sergienko V.I. *Vestnik Rossiyskoy Akademii meditsinskikh nauk* 2010; 1:27–39 (in russian).

5. Perelman J.M., Prikhodko A.G., Borodin E.A., Ushakova E.V. The role of oxidative stress in airway re-

sponse to hyposmolar stimulus in patients with bronchial asthma. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2014; 54:17–22 (in russian).

6. Pirogov A.B., Zinov'ev S.V., Perelman J.M., Semirech Yu.O., Semenova G.V., Kolosov A.V. Myeloperoxidase activity of neutrophils and eosinophils in induced sputum of patients with bronchial asthma with cold bronchial hyperresponsiveness. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2014; 53:50–56 (in russian).

7. Prikhodko A.G. Respiratory tract response to hyposmotic stimulus. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2005; 21:47–52 (in russian).

8. Sobchenko S.A., Beyda E.V., Kravtsov V.Yu. *Rossiyskiy semeynyy vrach* 2006; 4(10):31–33 (in russian).

9. Fomina D.S., Goryachkina L.A., Nenasheva N.M., Neshkova E.A. *Pul'monologiya* 2010; 2:82–86 (in russian).

10. Hayhoe F.G.H., Quagliano D. Hematological cytochemistry. Moscow: Meditsina; 1983 (in russian).

11. Khizhniak J.J., Perelman J.M., Kolosov V.P. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal* 2009; 1:82–84 (in russian).

12. Aldonyte R., Hutchinson E., Jin B., Brantly M. Block E., Patel J., Zhang J. Endothelial alpha-1-antitrypsin attenuates cigarette smoke induced apoptosis in vitro. *Eur. Respir. J.* 2008. Vol.5, №3. P.153–162.

13. Bakakos P., Schleich F., Alchanatis M., Louis R. Induced sputum in asthma: from bench to bedside. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18(10):1415–1422.

14. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 77(5):598–625.

15. Malle E., Marsche G., Arnhold J., Davies M.J. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1761(4):392–415.

16. Pattison D.I., Davies M.J. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Cur. Med. Chem.* 2006; 13(27):3271–3290.

Поступила 20.07.2015

Контактная информация

Алексей Борисович Пирогов,

кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории профилактики НЗЛ,

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,

675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: dncfpd@ramn.ru

Correspondence should be addressed to

Aleksey B. Pirogov,

MD, PhD, Associate professor, Senior staff scientist of Laboratory

of Prophylaxis of Non-Specific Lung Diseases,

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration,

22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: dncfpd@ramn.ru