

УДК 616.155.34:616.2-001.19:611.23-018.7]616.248-036.17

DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-47-55

## РОЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ И ЭПИТЕЛИЯ БРОНХОВ В ПОТЕРЕ КОНТРОЛЯ НАД БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ФОРМИРОВАНИИ РЕАКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ НА ХОЛОДОВОЙ СТИМУЛ

А.Г.Приходько, А.Б.Пирогов, Ю.М.Перельман

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

**РЕЗЮМЕ. Введение.** Нейтрофилы и бронхиальный эпителий принимают активное участие в генерации оксидативного стресса и прогрессировании воспаления дыхательных путей у больных бронхиальной астмой (БА). **Цель.** Изучить роль нейтрофилов и эпителия бронхов как факторов, способствующих потере контроля над астмой и формированию реакции дыхательных путей на холододовый стимул. **Материалы и методы.** Обследовано 146 больных с диагнозом персистирующей БА. Проведён анкетный опрос по вопроснику Asthma Control Test (ACT); исследование функции внешнего дыхания методом спирометрии с последующим сбором индуцированной мокроты; на следующий день выполнена проба 3-минутной изокпапнической гипервентиляции холодным ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) воздухом (ИГХВ) с последующим сбором спонтанно продуцируемой мокроты. В мокроте оценивали цитоз, клеточный состав, содержание гликопротеинов в бокаловидном эпителии. В 1 группу ( $n=89$ ) вошли лица с неконтролируемым ( $\text{ACT}<20$  баллов), во 2 группу ( $n=57$ ) – с контролируемым ( $\text{ACT}>20$  баллов) течением БА. **Результаты.** Больные 1 группы в сравнении со 2 группой имели более высокий прирост  $\text{ОФВ}_1$  на введение  $\beta_2$ -агониста короткого действия –  $11,0$  ( $5,4; 21,65$ ) и  $7,55$  ( $4,11; 13,8$ )%, соответственно ( $p=0,042$ ) и более выраженную реакцию на пробу ИГХВ –  $-11,0$  ( $-17,6; -2,5$ ) и  $-6,0$  ( $-12,0; -2,0$ )% ( $p=0,031$ ). У больных 1 группы после пробы ИГХВ наблюдался прирост числа нейтрофилов с  $45,98\pm 2,17$  до  $52,0\pm 1,78\%$  ( $p=0,0013$ ) и повышение концентрации гликопротеинов в мукоцитах с  $37,9\pm 3,8$  до  $45,6\pm 4,2\%$  ( $p=0,002$ ) на фоне тенденции к повышению содержания бокаловидных клеток и уменьшению количества неповрежденных бронхиальных эпителиоцитов (с  $4,8\pm 0,32$  до  $3,9\pm 0,30\%$ ;  $p=0,017$ ). Корреляционный анализ показал взаимосвязь между уровнем гликопротеинов бокаловидных клеток и исходным содержанием нейтрофилов в мокроте ( $r=-0,49$ ;  $p=0,039$ ), а также между степенью выраженности реакции дистальных бронхов ( $\Delta\text{МОС}_{50}$ ) на холододовый стимул и содержанием нейтрофилов в мокроте после пробы ( $r=0,36$ ;  $p=0,01$ ). **Заключение.** При остром холододовом воздействии у больных неконтролируемой БА в воспалительном паттерне наблюдаются признаки стимуляции нейтрофильного сегмента гранулоцитов и структурной перестройки бронхиального эпителия. Структурные изменения пула нейтрофилов и эпителиальной паренхимы бронхов, свидетельствующие об эскалации провоспалительной активности, могут лежать в основе возникновения и поддержания реакции дыхательных путей на холододовый стимул и потери контроля над БА.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, холододовая гиперреактивность дыхательных путей, нейтрофилы, бронхиальный эпителий, неконтролируемое течение астмы.

## ROLE OF NEUTROPHILS AND BRONCHIAL EPITHELIUM IN LOSS OF CONTROL OF BRONCHIAL ASTHMA AND FORMATION OF RESPIRATORY TRACT RESPONSE TO COLD STIMULUS

A.G.Prikhodko, A.B.Pirogov, J.M.Perelman

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

### Контактная информация

Анна Григорьевна Приходько, д-р мед. наук, главный научный сотрудник, лаборатория функциональных методов исследования дыхательной системы, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, Россия, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22. E-mail: prih-anya@ya.ru

### Correspondence should be addressed to

Anna G. Prikhodko, MD, PhD, D.Sc. (Med.), Main Staff Scientist, Laboratory of Functional Research of Respiratory System, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: prih-anya@ya.ru

### Для цитирования:

Приходько А.Г., Пирогов А.Б., Перельман Ю.М. Роль нейтрофилов и эпителия бронхов в потере контроля над бронхиальной астмой и формировании реакции дыхательных путей на холододовый стимул // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2020. Вып.78. С. 47–55. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-47-55

### For citation:

Prikhodko A.G., Pirogov A.B., Perelman J.M. Role of neutrophils and bronchial epithelium in loss of control of bronchial asthma and formation of respiratory tract response to cold stimulus. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* = *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2020; (78):47–55 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-47-55

**SUMMARY. Introduction.** Neutrophils and bronchial epithelium are actively involved in the generation of oxidative stress and the progression of airway inflammation in patients with asthma. **Aim.** To study the role of neutrophils and bronchial epithelium as factors contributing to the loss of control over asthma and the formation of the airway response to a cold stimulus. **Materials and methods.** A total of 146 patients with a diagnosis of persistent asthma were examined. A survey was conducted on the Asthma Control Test (ACT) questionnaire; a study of the lung function by spirometry with subsequent collection of induced sputum; the next day, a 3-minute isocapnic hyperventilation by cold ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) air (IHCA) was performed, followed by collection of spontaneously produced sputum. In the sputum, cytosis, cellular composition, and glycoprotein concentration in the goblet-like epithelium were assessed. Group 1 ( $n=89$ ) included persons with uncontrolled ( $\text{ACT}<20$  points), group 2 ( $n=57$ ) – with controlled ( $\text{ACT}>20$  points) asthma. **Results.** Patients of group 1 in comparison with group 2 had a higher increase in  $\text{FEV}_1$  to the inhalation of a short-acting  $\beta_2$ -agonist –  $11.0$  ( $5.4$ ;  $21.65$ ) vs.  $7.55$  ( $4.11$ ;  $13.8$ )%, respectively ( $p=0.042$ ) and a more pronounced reaction to the IHCA test –  $-11.0$  ( $-17.6$ ;  $-2.5$ ) vs.  $-6.0$  ( $-12.0$ ;  $-2.0$ )% ( $p=0.031$ ). In patients of group 1, after the IHCA test, an increase in the number of neutrophils was observed from  $45.98\pm 2.17$  to  $52.0\pm 1.78\%$  ( $p=0.0013$ ) and an increase in the concentration of glycoproteins in mucocytes from  $37.9\pm 3.8$  to  $45.6\pm 4.2\%$  ( $p=0.002$ ) against the background of a tendency towards an increase in the concentration of goblet cells and a decrease in the number of intact bronchial epithelial cells (from  $4.8\pm 0.32$  to  $3.9\pm 0.30\%$ ;  $p=0.017$ ). Correlation analysis showed the relationship between the level of goblet cell glycoproteins and the initial concentration of neutrophils in sputum ( $r=-0.49$ ;  $p=0.039$ ), as well as between the severity of the reaction of the distal bronchi ( $\Delta\text{MEF}_{50}$ ) to a cold stimulus and the concentration of neutrophils in sputum after IHCA ( $r=0.36$ ;  $p=0.01$ ). **Conclusion.** The signs of stimulation of the neutrophilic segment of granulocytes and structural rearrangement of the bronchial epithelium in the sputum of patients with uncontrolled asthma after acute cold exposure were determined. Structural changes in the pool of neutrophils and epithelial parenchyma of the bronchi, indicating an escalation of pro-inflammatory activity, may underlie the emergence and maintenance of the airway response to a cold stimulus and loss of asthma control.

*Key words: bronchial asthma, cold airway hyperresponsiveness, neutrophils, cytokines, bronchial epithelium, uncontrolled asthma.*

Клинический феномен холодовой гиперреактивности дыхательных путей (ХГДП), выявляемый у больных бронхиальной астмой (БА) в экологически неблагоприятных условиях Сибири и Дальнего Востока под воздействием на дыхательную систему холодого триггера, ассоциируется с утяжелением течения астмы, сложной проблемой контроля над болезнью и активацией смешанного паттерна воспаления бронхов. Последний отличается многочисленностью пула нейтрофилов, их выраженной пероксидазной активностью, высокими показателями деструкции и цитолиза [1, 2].

Установлено, что повышенный уровень нейтрофилов регистрируется в бронхоальвеолярном лаваже у терапевтически резистентных больных БА, получавших высокие дозы системных кортикостероидов, в то время как у пациентов, не получавших последние, преобладала эозинофилия [3]. В период тяжелых обострений, фатальных атак астмы в дыхательных путях доминирует нейтрофильное воспаление [3], которое усугубляет течение болезни, ограничивает возможность достижения контроля над болезнью. Как показали наши исследования, нейтрофильный характер воспаления бронхов у больных БА связан с более значимым нарушением бронхиальной проходимости и большей частотой выявления реакции дыхательных путей на холодный воздух [1, 4].

Вовлечение нейтрофильного сегмента гранулоцитов под воздействием различных триггеров генерирует в бронхах, помимо оксидативного стресса, другие медиаторы клеточного окисления, представляющие собой сигнальные молекулы, регулирующие активность ядерного фактора NF-kB – одного из главных

транскрипционных факторов, отвечающего за адаптивные реакции клеток [5, 6]. NF-kB ассоциирован с активностью воспаления при астме и экспрессией провоспалительных цитокинов, которые активируют каскад воспалительных реакций, обуславливающих тяжелое клиническое течение БА [6]. В случае сопутствующей ХГДП снижение противовирусного иммунитета, реализующееся за счет подавления антивирусной и иммуномодуляторной активности IFN путём активации NF-kB и экспрессии генов провоспалительных цитокинов [7], может являться причиной персистенции инфекции в бронхиальном дереве и рассматривается как один из потенциальных независимых механизмов неконтролируемого течения болезни [6]. Бронхиальный эпителий, активирующий NF-kB, а также экспрессирующий гены провоспалительных цитокинов, обладает способностью подавлять активность IFN респираторного тракта [7]. С помощью иммуногистохимических методов в бронхиальном эпителии больных БА зарегистрированы вдвое более частые признаки активированного состояния NF-kB по сравнению с контролем [6]. В результате активации NF-kB эпителий индуцирует гиперреактивность бронхов, опосредованную эпителиальной продукцией бронхоконстрикторных белков [8].

Ввиду ключевой роли нейтрофилов и непосредственного участия бронхиального эпителия в инициации повреждающих эффектов оксидативного стресса, прогрессировании воспаления дыхательных путей у больных БА, возникает вопрос о возможной связи между отсутствием контроля заболевания и структурно-функциональными особенностями пула нейтрофилов и эпителиальной выстилки бронхов.

Цель работы – оценить роль нейтрофилов и эпителия бронхов как факторов, способствующих потере контроля над астмой и формированию реакции дыхательных путей на холодовой стимул.

### Материалы и методы исследования

Исследование проводилось с соблюдением международных принципов проведения медицинских исследований с участием человека на основании разрешения локального комитета по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания. В наблюдательном исследовании приняли участие 146 больных с диагнозом персистирующей БА [9], обоего пола, в возрасте от 18 до 60 лет. Набор больных осуществлялся в сезон года с низкими температурами окружающего воздуха (2013–2018 гг.).

Критерии включения: наличие БА, длительность болезни более  $\geq 1$  года, объём форсированного выдоха за первую секунду ( $ОФВ_1$ ) более 75% от должной величины; отсутствие сопутствующих заболеваний, способных повлиять на результаты проводимых тестов, письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Дизайн исследования включал клинический осмотр больных и оценку тяжести по данным анкетного опроса по вопроснику Asthma Control Test (Quality Metric Inc., 2002); выполнялось спирометрическое исследование (Easy on PC, ndd Medizintechnik AG, Швейцария) с оценкой параметров  $ОФВ_1$ ,  $МОС_{50}$ ,  $МОС_{25-75}$ . Бронходилатационный тест проводили путем ингаляции аэрозоля сальбутамола (400 мкг),  $ОФВ_1$  регистрировали до и через 15 минут после введения  $\beta_2$ -агониста. Затем проводили сбор мокроты путем ультразвуковой ингаляции 3-, 4- и 5%-го раствора хлорида натрия сеансами по 7 минут, используя небулайзер NE-U-17 (OMRON, Япония) [10]. На следующий день выполняли бронхопровокационную пробу с 3-минутной изокапнической гипервентиляцией холодным ( $-20^\circ\text{C}$ ) воздухом (ИГХВ) [11] с регистрацией параметров бронхиальной проходимости до и после ИГХВ ( $\Delta ОФВ_1$ , %,  $\Delta МОС_{50}$ , %,  $\Delta МОС_{25-75}$ , %). После теста ИГХВ осуществляли сбор спонтанно продуцируемой мокроты.

Исследование мокроты проводили не позднее 2 часов после её получения. В образцах мокроты оценивали цитоз, подсчитывая число клеток в 1 мкл. В камере Горяева определяли количество клеток в единице нативного материала мокроты стандартным методом. С целью уточнения состава клеток мокроту (50 мкл) наносили на предметное стекло, подогретое до  $37^\circ\text{C}$ , просушивали в вентилируемом термостате ТМ-2 в течение 5–10 минут при  $37^\circ\text{C}$ , мазки фиксировали в парах 40% раствора формалина (10 минут), окрашивали 4–5% водным красителем Романовского-Гимза (рН 6,8). Состав клеточных элементов изучали, используя светооптический иммерсионный микроскоп, с подсчётом не менее 400 клеток в 100 полях зрения, в

центральных и периферических частях препарата. Найденное число клеток выражали в процентах к общему количеству [12].

Для изучения содержания гликопротеинов в бокаловидном эпителии после фиксации препаратов в формалине использовали метод окраски цитологических мазков альциановым синим, селективно выявляющим муцины (гликопротеины, кислые гликозаминогликаны – ГАГ) в цитоплазме бокаловидных клеток [12]. Гликопротеины и ГАГ в бокаловидном эпителии оценивали путём подсчёта количества окрашенных альциановым синим клеток, выражали в процентах.

Статистический анализ полученного материала проводили с использованием программы «Автоматизированная система диспансеризации» [13] на основе стандартных методов вариационной статистики. При нормальном типе распределения использовали непарный и парный критерий  $t$  (Стьюдента), при распределении данных, отличных от нормального, применяли критерии Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни. Описательная статистика количественных признаков представлена средним арифметическим и стандартной ошибкой среднего арифметического ( $M \pm m$ ), а также медианой и квартилями  $Me(Q1; Q3)$ . С целью определения степени связи между двумя случайными величинами проводили классический корреляционный анализ, а также непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Для всех величин принимали во внимание уровни значимости ( $p$ ) менее 0,05.

### Результаты исследования и их обсуждение

Распределение больных в группы проводилось по результатам анкетного опроса Asthma Control Test (ACT) по критерию контроля заболевания. В 1 группу ( $n=89$ ) вошли лица с неконтролируемым ( $ACT < 20$  баллов), во 2 группу ( $n=57$ ) – с контролируемым ( $ACT > 20$  баллов) течением БА (табл. 1). Больные с низким контролем заболевания имели более высокую лабильность бронхов как на введение  $\beta_2$ -агонистов короткого действия, так и при стимуляции дыхательных путей холодным воздухом (табл. 1). Частота выявления ХГДП в 1 группе составила 48%, во 2 группе – 32% ( $\chi^2=3,34$ ;  $p > 0,05$ ).

При отсутствии межгрупповых статистических различий в базовых показателях вентиляционной функции легких, в 1 группе обнаружена корреляционная связь индекса курильщика (ИК, пачка/лет) с проходимостью дистальных бронхов ( $МОС_{25-75}$ , %) ( $r=-0,21$ ;  $p=0,013$ ), а также с выраженностью реакции дыхательных путей на холодовой стимул ( $\Delta ОФВ_1$ , %) ( $r=-0,42$ ;  $p=0,008$ ). Прогрессирование нарушений функции внешнего дыхания при табакокурении поддерживается ремоделированием бронхов, обусловленным оксидативным повреждением, бокаловидно-клеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией бронхиального эпителия, продукцией провоспалительных цитокинов, разрушением соединительнотканного матрикса

нейтрофильными протеиназами, интерстициальным фиброзом, гиперсекрецией бронхиальной слизи и мукоцилиарной недостаточностью [14]. В выполненных нами ранее работах показано, что бронхиальный и бокаловидный эпителий дыхательных путей курящих больных БА с ХГДП подвержен значительной дезорганизации и активации деструктивно-цитолитических процессов, сопровождающихся увеличением секреторной активности бокаловидных клеток [15]. Интенсификация бокаловидно-клеточной секреции гликопротеинов сопряжена с повышением пероксидазной активности гранулоцитов, инфильтрирующих дыхательные пути курящих пациентов и нейтрофилией воспаления, способствующей появлению и поддержанию ХГДП, ухудшению проходимости бронхов с утратой контроля над болезнью [15].

После проведения бронхопровокации холодным воздухом в обеих группах наблюдалось увеличение ци-

тоза в мокроте (табл. 2). Для больных с неконтролируемым течением астмы был характерен прирост числа нейтрофилов после пробы ИГХВ, тогда как у больных 2 группы в мокроте отмечалось увеличение эозинофилов. В результате происходящих изменений в численности гранулоцитов в мокроте больных обеих групп наблюдалось пропорциональное снижение числа макрофагов (табл. 2). Кроме того, в обеих группах после пробы регистрировалось снижение числа клеток бронхиального эпителия, что служило признаком разрушения, деструкции и некроза клеточных элементов дезинтегрированного эпителиального пласта, и рост числа бокаловидных эпителиоцитов, в большей степени у больных 2 группы (табл. 2). Важно отметить, что схожая картина в динамике показателей после пробы ИГХВ наблюдалась при отдельном анализе группы больных с ХГДП и неконтролируемым течением болезни (рис.).

Таблица 1

Клинико-функциональная характеристика больных БА

Показатель	1 группа (n=89)	2 группа (n=57)	p
Возраст, лет	38,8±1,2	40,4±1,5	>0,05
Курящих лиц, %	57	62	$\chi^2=0,11$ ; p>0,05
АСТ, баллы	13,3±0,4	22,8±0,3	<0,0001
ОФВ <sub>1</sub> /ЖЕЛ, %	73,0±1,0	74,0±1,2	>0,05
ОФВ <sub>1</sub> , %	89,7±1,8	94,9±2,2	>0,05
МОС <sub>25-75</sub> , %	64,6±2,7	72,1±3,6	>0,05
ΔОФВ <sub>1</sub> игхв, %	-11,0 (-17,6; -2,5)	-6,0 (-12,0; -2,0)	0,031
ΔМОС <sub>50</sub> игхв, %	-16,9±2,38	-16,3±2,15	>0,05
ΔМОС <sub>25-75</sub> игхв, %	-17,2±2,4	-15,5±2,2	>0,05
ΔОФВ <sub>1</sub> бл, %	11,0 (5,4; 21,65)	7,55 (4,11; 13,8)	0,042

Примечание: Δ, игхв – изменение показателя в ответ на пробу с ИГХВ; Δ, бл – изменение показателя в ответ на введение бронхолитика; p – значимость различий значений показателей между группами пациентов с неконтролируемым и контролируемым течением БА.

Таблица 2

Цитологическое исследование мокроты больных БА

Показатель	1 группа	p	2 группа	p
Цитоз, клеток/1 мкл	<u>2,26±0,20</u> 2,99±0,19	0,001	<u>2,22±0,23</u> 2,71±0,29	0,044
Нейтрофилы, %	<u>45,98±2,17</u> 52,0±1,78	0,0013	<u>45,8±2,45</u> 48,9±2,35	>0,05
Эозинофилы, %	<u>11,6±1,6</u> 12,7±1,7	>0,05	<u>10,5±1,6</u> 17,2±3,0	0,038
Макрофаги, %	<u>34,1±2,3</u> 27,3±1,5	0,002	<u>34,8±2,7</u> 25,7±1,7	0,00001
Бронхиальный эпителий, %	<u>4,8±0,32</u> 3,9±0,30	0,017	<u>4,4±0,33</u> 3,8±0,32	>0,05
Бокаловидные клетки эпителия, %	<u>0,31±0,06</u> 0,32±0,04	>0,05	<u>0,30±0,08</u> 0,59±0,09	0,025
Гликопротеины в цитоплазме бокаловидных клеток эпителия, %	<u>37,9±3,8</u> 45,6±4,2	0,002	<u>37,2±3,5</u> 44,0±4,0	0,04

Примечание: в числителе базовые значения показателя, в знаменателе – после пробы ИГХВ; p – значимость различий между числителем и знаменателем.



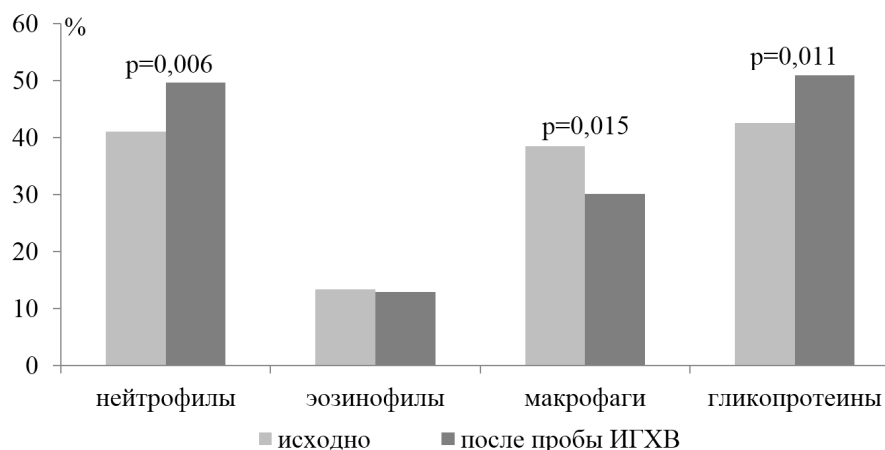


Рис. Динамика изменений клеточного состава и гликопротеинов мокроты после пробы ИГХВ у больных БА с ХГДП и неконтролируемым течением болезни.

Увеличение числа клеток бокаловидного эпителия, наиболее вероятно, было связано с усиленной потребностью в протеогликанах в процессе развития реакции на холодное воздействие, о чем свидетельствовало повышение содержания гликопротеинов в цитоплазме бокаловидных клеток в ответ на пробу ИГХВ (табл. 2). Обнаружена тесная связь между ростом числа бокаловидных клеток и усилением реакции мелких дыхательных путей ( $\Delta\text{МОС}_{25-75}$  игхв) на холодовую бронхопровокацию ( $r=-0,44$ ,  $p=0,006$ ).

Сведения, указывающие на стимуляцию муциновой активности эпителия под влиянием холода, подтверждаются ранее полученными нами данными, касающимися структурной организации и секреторной активности железистого эпителия у больных БА с ХГДП. Так, было показано, что в ответ на воздействие холодового стимула происходит увеличение числа бронхиальных эпителиоцитов, дающих положительную реакцию при окраске на ГАГ, установлена корреляция между активацией синтеза и накопления ГАГ в мукоцитах, интенсификацией эпителиальной секреции и усилением бронхиальной обструкции. Кроме того, было доказано, что увеличение концентрации гликопротеинов в эпителии приводит к усилению реакции дыхательных путей на холод [16].

У больных с неконтролируемым течением БА (1 группа) обнаружена тесная взаимосвязь между уровнем гликопротеинов бокаловидных клеток и исходным содержанием нейтрофилов в мокроте ( $r=-0,49$ ;  $p=0,039$ ), позволившая констатировать зависимость продукции муцинов в бокаловидном сегменте эпителия от количества нейтрофилов в воспалительном паттерне бронхов. Важно отметить, что у этих же больных прослеживалась связь между степенью выраженности реакции дистальных бронхов ( $\Delta\text{МОС}_{50}$  игхв) на холодовый стимул и содержанием нейтрофилов в мокроте после пробы ( $r=0,36$ ;  $p=0,01$ ).

От эскалации функциональной активности, дегрануляции и деструкции нейтрофилов бронхиального инфильтрата у больных БА зависит интенсификация деструкции бронхиального эпителия, развивающаяся

под влиянием холодового стимула и приводящая к ремоделированию бронхов [2]. Деструкция эпителия, наиболее выраженная у пациентов со смешанным паттерном воспаления бронхов, наряду с другими морфологическими характеристиками ремоделирования слизистой оболочки, оказывает негативное влияние на проходимость дыхательных путей и клинические проявления БА, служит неблагоприятным прогностическим фактором течения болезни [2].

Известно, что экзоцитоз, или секреция нейтрофилами лизосомальных ферментов осуществляется не только при физиологической дегрануляции, но и в результате деструкции и цитолиза клеток, которые являются патогномоничными для оксидативного стресса, и дифференциальным признаком которых служит вакуолизация и фрагментация цитоплазмы [17]. При оксидативном стрессе наиболее важная роль среди ферментов, секретируемых лизосомами нейтрофилов, принадлежит миелопероксидазе из класса оксидоредуктаз, катализирующей синтез высоко-реакционно-способных галогенсодержащих соединений, активных форм галогенов [1, 4, 17]. Экспортируемая нейтрофилами генерация активных форм кислорода и галогенов может стать причиной свободно-радикального повреждения крист митохондрий и разрушения эндоплазматического ретикула бронхиального эпителия с последующей гибелью клеток [18]. При этом сигналы апоптоза могут передаваться в эпителий не от лигирования рецептора смерти до активации каспазного каскада, а путем дезэнергизации эпителиоцитов [18].

Окислительное повреждение эпителия дыхательных путей приводит к экзоцитозу из интраэпителиально расположенных нервных окончаний – С-волокон «третьей» сигнальной нервной системы (NANC) субстанции Р и нейрокининов А и В – нейротрансмиттеров с выраженными бронхоконстрикторным и вазодилаторным эффектами, активирующих тучные клетки, макрофаги, Т- и В-лимфоциты. Данные нейротрансмиттеры усиливают сосудистую адгезию и являются хемоаттрактантами для эозинофилов и нейтрофилов. Происходит ингибирование синтезируе-

мого нейросекреторными клетками бронхиального покрова иммуномодулирующего бронхо- и вазодилатора – вазоактивного интестинального пептида (VIP), нарушение выработки PgE2, экспрессируются поверхностные клеточные рецепторы, провоспалительные цитокины, хемоаттрактанты, GMCSF [19]. Доказано, что эпителиальные клетки из бронхобиоптатов, полученных от больных БА, отличаются значительным усилением продукции GMCSF и экспрессии провоспалительных IL-6, IL-8, резко возрастающей под воздействием поллютантов [20].

С помощью IL-8, ассоциирующегося с сочетанием у астматиков бронхиального нейтрофильного и системного воспаления [21, 22], осуществляется праймирование респираторного взрыва нейтрофилов [23]. В качестве хемокина IL-8 играет ключевую роль в хемоаттракции нейтрофилов: стимулирует миграцию нейтрофилов из кровеносного русла в очаг воспаления, повышает в них концентрацию внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , что обеспечивает движение лейкоцитов и активирует пентозофосфатный шунт в этих клетках, вызывая продукцию свободных радикалов, дегрануляцию и экзоцитоз нейтрофильных ферментов [24]. Интеграция IL-8 с IL-1, GMCSF, TNF $\alpha$  и другими провоспалительными цитокинами составляет цитокиновый фон, активирующий нейтрофилы [24], которые, в свою очередь, самостоятельно синтезируют и продуцируют цитокины – нейтрофилокины (GMCSF, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8), участвующие в кооперативном взаимодействии клеток фагоцитарной системы. Последние действуют паракринно на макрофаги, аутокринно – на нейтрофилы [25]. При этом экспрессия IL-8, IL-10, TNF $\alpha$  и других хемокинов осуществляется под контролем NF-kB, оказывающим стимулирующее влияние на многочисленные гены, задействованные в иммунном, острофазовом и воспалительном ответах [5].

Индукция NF-kB является основополагающим моментом, объединяющим окислительные функции нейтрофилов и провоспалительную активность эпителия бронхов при астме и играющим важную роль в патогенезе астматической бронхоконстрикции. Вследствие индукции NF-kB бронхиальными эпителиоцитами бронхоальвеолярные смывы у больных БА содержат повышенное содержание IL-1 и IL-1b [8]. Согласно наблюдениям *in vitro*, в дыхательных путях трансгенных мышей, экспрессирующих индуцируемую доксициклином конститутивно активную версию IKK- $\beta$ , приводящую к активации NF-kB, происходит усиление гиперчувствительности эпителиальных клеток, утолщение лейомиоцитов мышечного слоя при отсутствии эозинофилии слизистой оболочки и режима сенсibilизации к антигену. С ингибированием экспрессии NF-kB бронхиальным эпителием связано ослабление аллергического воспаления дыхательных путей [26].

Базирующийся на индукции NF-kB провоспалительный синергизм пула нейтрофилов и эпителия дыхательных путей, которые принимают участие в

формировании реакции дыхательных путей на холодовой стимул можно описать дискриминантной моделью в виде следующего уравнения, построенного исходя из совокупности всех проанализированных показателей больных с неконтролируемым и контролируемым течением астмы:

$$D = -3,63 \times BЭ + 1,48 \times H,$$

где D – дискриминантная функция с граничным значением 53,1; BЭ – число клеток бронхиального эпителия в мокроте (в %); H – базовое содержание нейтрофилов в мокроте (в %).

Превышение граничного значения свидетельствует о плохом контроле болезни, связанном с явлениями нейтрофилии мокроты. Построенное уравнение подтверждает влияние высокого содержания нейтрофилов и клеток бронхиального эпителия в мокроте на уровень контроля астмы и служит свидетельством предикторной роли пула нейтрофилов и эпителиальной выстилки дыхательных путей в характере клинического течения болезни. Эскалация содержания нейтрофилов, как доминирующих продуцентов окислителей и свободных радикалов в воспалительном паттерне бронхов, в сочетании с интенсификацией деструкции и провоспалительной активности бронхиального эпителия, может рассматриваться в качестве фактора, не только участвующего в появлении и потенцировании реакции бронхов на холод, но и как фактора, способствующего потере контроля над болезнью.

### Выводы

1. В результате острого холодового воздействия, у больных с неконтролируемой астмой в воспалительном паттерне отмечаются признаки стимуляции нейтрофильного сегмента гранулоцитов, проявляющиеся в увеличении количества нейтрофилов мокроты, усилении деструкции и секреторной активности бронхиального эпителия, снижении содержания эпителиальных клеток с неповрежденной структурой, повышении концентрации гликопротеинов в бокаловидных клетках.

2. Структурные изменения пула нейтрофилов и эпителиальной паренхимы бронхов, свидетельствующие об эскалации провоспалительной активности, могут лежать в основе возникновения и поддержания реакции дыхательных путей на холодовой стимул и потере контроля над астмой.

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

### Источники финансирования

Исследование проводилось без участия спонсоров

### Funding Sources

This study was not sponsored

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Зиновьев С.В. Влияние нейтрофильного компонента бронхиального воспаления на уровень контроля болезни и функцию внешнего дыхания у больных бронхиальной астмой // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2016. Вып.61. С.16–24. doi: 10.12737/21434
2. Пирогов А.Б., Гассан Д.А., Зиновьев С.В., Приходько А.Г., Колосов В.П., Перельман Ю.М. Деструкция эпителия бронхов у больных тяжелой бронхиальной астмой при различных паттернах воспаления и холодовой гиперреактивности дыхательных путей // Терапевтический архив. 2019. Т.91, №3. С.31–35. doi: 10.26442/00403660.2019.03.000091
3. Огородова Л.М., Селиванова П.А., Геренг Е.А., Богомяков В.С., Волкова Л.И., Плешко Р.И. Патоморфологическая характеристика нестабильной бронхиальной астмы (фенотип brittle) // Терапевтический архив. 2008. Т.80, №3. С.39–43.
4. Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Зиновьев С.В. Динамика воспалительно-клеточного профиля бронхов и нейтрофильного компонента воспаления у больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей при применении базисной противовоспалительной терапии // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2016. Вып.60. С.16–22. doi: 10.12737/19935
5. Маянский А.Н., Маянский Н.А., Заславская М.И. Нуклеарный фактор-kB и воспаление // Цитокины и воспаление. 2007. Т.6. №2. С.3–9.
6. Куликов Е.С., Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Деев И.А., Селиванова П.А., Федосенко С.В., Кириллова Н.А. Молекулярные механизмы тяжелой бронхиальной астмы // Молекулярная медицина. 2013. №2. С.24–32.
7. Wei L., Sandbulte M.R., Thomas P.G., Webby R.J., Homayouni R., Pfeffer L.M. NF-kappa B negatively regulates interferon-induced gene expression and anti-influenza activity // J. Biol. Chem. 2006. Vol.281, №17. P.11678–11684. doi: 10.1074/jbc.m513286200
8. Sheller J.R., Polosukhin V.V., Mitchell D., Cheng D-S., Stokes Peebles R., Blackwell T.S. NF-kB induction in airway epithelium increases lung inflammation in allergen challenged mice // Exp. Lung Res. 2009. Vol.35, №10. P.883–895. doi: 10.3109/01902140903019710
9. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (2018 update). URL: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org).
10. Bakakos P., Schleich F., Alchanatis M., Louis R. Induced sputum in asthma: From bench to bedside // Curr. Med. Chem. 2011. Vol.18, №10. P.1415–1422. doi: 10.2174/092986711795328337
11. Перельман Ю.М., Приходько А.Г. Методика комбинированной диагностики нарушений кондиционирующей функции и холодовой гиперреактивности дыхательных путей // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2002. Вып.12. С.22–28.
12. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике в 2 т. / под ред. А.И.Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 472 с.
13. Ульянычев Н.В. Системность научных исследований в медицине. Saarbrücken: LAP LAMBERT, 2014. 140 с.
14. Краснова Ю.Н. Влияние табачного дыма на органы дыхания // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2015. №6. С.11–16.
15. Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Колосов В.П., Перельман Ю.М. Взаимосвязь курения с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей и течением деструктивно-цитолитических процессов в бокаловидном эпителии бронхов больных бронхиальной астмой // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т.18, №3. С.90–100. doi:10.20538/1682-0363-2019-3-90-100
16. Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Зиновьев С.В., Сян Дун Чжоу, Ци Ли. Изменения бокаловидного эпителия в ответ на холодовую бронхопровокацию у больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2018. Вып.68. С.8–16. doi: 10.12737/article\_5b188b4bad3200.10559927
17. Пирогов А.Б., Зиновьев С.В., Перельман Ю.М., Семиреч Ю.О., Семенова Г.В., Колосов А.В. Активность миелопероксидазы нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов индуцированной мокроты у больных бронхиальной астмой с холодовой бронхиальной гиперреактивностью // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2014. Вып.53. С.50–56.
18. Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling // Cell. Mol. Immunol. 2007. Vol.4. №6. P.419–429.
19. Конищева А.Ю., Гервасиева В.Б., Лаврентьева Е.Е. Особенности структуры и функции респираторного эпителия при бронхиальной астме // Пульмонология. 2012. Т.22, №5. С.85–91. doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-5-85-91
20. Hashimoto S., Matsumoto K., Gon Y., Takahashi N. Update on airway inflammation and remodeling in asthma // Allergy Clin. Immunol. Int. 2007. Vol.19, №5. P.178–174. doi: 10.1027/0838-1925.19.5.178

21. Puthothu B., Krueger M., Heinze J., Forster J., Heinzmann A. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections // Clin. Mol. Allergy. 2006. Vol.4. Article number 2. doi: 10.1186/1476-7961-4-2
22. Wood L.G., Baines K.I., Fu J. Scott H.A., Gibson P.G. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma // Chest. 2012. Vol.142, №1. P.86–93. doi: 10.1378/chest.11-1838
23. Маянский А.Н. НАДФ-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция // Цитокины и воспаление. 2007. Т.6, №3. С.3–13.
24. Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж. Роль цитокинов в воспалительном процессе (сообщение 1) // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2008. №6. С.5–8.
25. Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами // Иммунология. 2000. Т.21, №5. С.11–17.
26. Pantano C., Ather J.L., Alcorn J.F., Poynter M.E., Brown A.L., Guala A.S., Beuschel S.L., Allen G.B., Whittaker L.A., Bevelander M., Irvin C.G., Janssen-Heininger Y.M. Nuclear factor-kappaB activation in airway epithelium induces inflammation and hyperresponsiveness // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2008. Vol.177, №9. P.959–969. doi: 10.1164/rccm.200707-1096oc

## REFERENCES

1. Pirogov A.B., Prikhodko A.G., Perelman J.M., Zinov'ev S.V. Influence of neutrophilic component of bronchial inflammation on the level of disease control and lung function in patients with asthma. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ*=*Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2016; (61):16–24 (in Russian). doi: 10.12737/21434
2. Pirogov A.B., Gassan D.A., Zinov'ev S.S., Prikhodko A.G., Kolosov V.P., Perelman J.M. Destruction of the bronchial epithelium in patients with severe asthma according to different patterns of inflammation and cold airway hyperresponsiveness. *Terapevticheskiy arkhiv*=*Therapeutic archive* 2019; 91(3):31–35 (in Russian). doi: 10.26442/00403660.2019.03.000091
3. Ogorodova L.M., Selivanova P.A., Gereng E.A., Bogomyakov V.S., Volkova L.I., Pleshko R.I. Pathomorphological characteristics of unstable bronchial asthma (brittle phenotype). *Terapevticheskiy arkhiv*=*Therapeutic archive* 2008; (3):39–43 (in Russian).
4. Pirogov A.B., Prikhodko A.G., Perelman J.M., Zinov'ev S.V. Dynamics of inflammatory-cellular profile of the induced sputum in patients with bronchial asthma and cold airway hyperresponsiveness under basic anti-inflammatory therapy. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ*=*Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2016; (60):16–22 (in Russian). doi: 10.12737/19935
5. Mayansky A.N. NADPH-oxidase of neutrophils: activation and regulation. *Tsitokiny i vospalenie* 2007;6(3):3–13 (in Russian).
6. Kulikov E.S., Ogorodova L.M., Freidin M.B., Deev I.A., Selivanova P.A., Fedosenko S.V., Kirillova N.A. Molecular mechanisms of severe asthma. *Molekulyarnaya meditsina* 2013; (2):24–32 (in Russian).
7. Wei L., Sandbulte M.R., Thomas P.G., Webby R.J., Homayouni R., Pfeffer L.M. NFkappa B negatively regulates interferon-induced gene expression and anti-influenza activity. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(17):11678–11684. doi: 10.1074/jbc.m513286200
8. Sheller J.R., Polosukhin V.V., Mitchell D., Cheng D-S., Stokes Peebles R., Blackwell T.S. NF-kB induction in airway epithelium increases lung inflammation in allergen challenged mice. *Exp. Lung Res.* 2009; 35(10):883–895. doi: 10.3109/01902140903019710
9. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (2020 update). Available at: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org).
10. Bakakos P., Schleich F., Alchanatis M., Louis R. Induced sputum in asthma: From bench to bedside. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18(10):1415–1422. doi: 10.2174/092986711795328337
11. Perelman J.M., Prikhodko A.G. Combined diagnostics technique of assessing conditioning function and cold hyperreactivity of respiratory tract. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ*=*Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2002; (12):22–28 (in Russian).
12. Karpishhenko A.I. editor. Medical laboratory technologies: a guide on clinical laboratory diagnostics. Moscow: GEOTAR-Media; 2012 (in Russian)
13. Ul'yanychev N.V. Systematic research in medicine. Saarbrücken: LAP LAMBERT; 2014 (in Russian).
14. Krasnova Y.N. Effect of tobacco smoking on the respiratory system. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)* 2015; (6):11–16 (in Russian).
15. Pirogov A.B., Prikhodko A.G., Kolosov V.P., Perelman J.M. The influence of smoking on the formation of airway hyperresponsiveness to cold and the course of destructive-cytological processes in the goblet cells of the bronchial epithelium in patients with asthma. *Bulletin of Siberian Medicine* 2019; 18(3):90–100 (in Russian). doi: 10.20538/1682-0363-2019-3-90-100



16. Pirogov A.B., Prikhodko A.G., Perelman J.M., Zinoviev S.V., Zhou X., Li Q. The change of goblet cells in response to cold bronchial challenge in patients with bronchial asthma with cold airway hyperresponsiveness. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya*=*Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2018; (68):8–16 (in Russian). doi: 10.12737/article\_5b188b4bad3200.10559927
17. Pirogov A.B., Zinov'ev S.V. Perelman J.M., Semirech Y.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 dyhaniya*=*Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2014; (53):50–56 (in Russian).
18. Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling. *Cell. Mol. Immunol.* 2007; 4(6):419–429.
19. Konishcheva A.Y., Gervazieva V.B., Lavrentyeva E.E. Changes in structure and function of respiratory epithelium in bronchial asthma. *Pulmonologiya* 2012; (5):85–91 (in Russian). doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-5-85-91
20. Hashimoto S., Matsumoto K., Gon Y., Takahashi N. Update on airway inflammation and remodeling in asthma. *Allergy Clin. Immunol. Int.* 2007; 19(5):178–174. doi: 10.1027/0838-1925.19.5.178
21. Puthothu B., Krueger M., Heinze J., Forster J., Heinzmann A. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clin. Mol. Allergy* 2006; 4:2. doi: 10.1186/1476-7961-4-2
22. Wood L.G., Baines K.I., Fu J. Scott H.A., Gibson P.G. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma. *Chest* 2012; 142(1):86–93. doi: 10.1378/chest.11-1838
23. Mayansky A.N. NADPH-oxidase of neutrophils: activation and regulation. *Tsitokiny i vospalenie* 2007; 6(3):3–13 (in Russian).
24. Serebrennikova S., Seminsky I. The role of cytokines in the inflammatory process (part 1). *Siberian Medical Journal (Irkutsk)* 2008; (6):5–8 (in Russian).
25. Vasil'eva G.I., Ivanova I.A., Tyukavkina S.Yu. Cooperative interaction of mono- and polynuclear phagocytes mediated by mono- and neutrophilokines. *Immunologiya* 2000; 21(5):11–17 (in Russian).
26. Pantano C., Ather J.L., Alcorn J.F., Poynter M.E., Brown A.L., Guala A.S., Beuschel S.L., Allen G.B., Whittaker L.A., Bevelander M., Irvin C.G., Janssen-Heininger Y.M. Nuclear factor-kappaB activation in airway epithelium induces inflammation and hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 177(9):959–969. doi: 10.1164/rccm.200707-1096oc

**Информация об авторах:**

**Анна Григорьевна Приходько**, д-р мед. наук, главный научный сотрудник, лаборатория функциональных методов исследования дыхательной системы, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: prih-anya@ya.ru

**Алексей Борисович Пирогов**, канд. мед. наук, доцент, старший научный сотрудник, лаборатория профилактики неспецифических заболеваний легких, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: dncfpd@dncfpd.ru

**Юлий Михайлович Перельман**, член-корреспондент РАН, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе, зав. лабораторией функциональных методов исследования дыхательной системы, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: jperelman@mail.ru

**Author information:**

**Anna G. Prikhodko**, MD, PhD, D.Sc. (Med.), Main Staff Scientist, Laboratory of Functional Research of Respiratory System, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: prih-anya@ya.ru

**Aleksey B. Pirogov**, MD, PhD (Med.), Associate Professor, Senior Staff Scientist, Laboratory of Prophylaxis of Non-Specific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: dncfpd@dncfpd.ru

**Juliy M. Perelman**, MD, PhD, D.Sc. (Med.), Corresponding member of RAS, Professor, Deputy Director on Scientific Work, Head of Laboratory of Functional Research of Respiratory System, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: jperelman@mail.ru

Поступила 15.09.2020  
Принята к печати 30.09.2020

Received September 15, 2020  
Accepted September 30, 2020