

УДК 577.152.313/.315:616.155.34]616.248:616-001.19

DOI: 10.36604/1998- 5029-2020-78-56-65

ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ХОЛОДОВОГО СТИМУЛА

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

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

РЕЗЮМЕ. Введение. Лабиллизация лизосомных мембран с высвобождением широкого спектра лизосомных ферментов провоспалительного и проапоптотического действия, обладающих высоким гидролитическим потенциалом, выступает одним из существенных компонентов адаптивных изменений клеток при стрессе. Участие гидролитических ферментов фагоцитов в клеточных реакциях воспаления и адаптации к холодовому стрессу у больных бронхиальной астмой (БА) мало исследовано. **Цель.** Изучить активность гидролаз нейтрофилов бронхов больных БА при холод-индуцированном стрессе. **Материалы и методы.** У больных персистирующей БА (n=13) методом спирометрии определяли функцию внешнего дыхания ($ОФВ_1$, %), реакцию дыхательных путей ($\Delta ОФВ_1$ ИГХВ, %) на стандартную 3-минутную изокапническую гипервентиляцию холодным воздухом (ИГХВ). Проводили сбор индуцированной и спонтанно продуцируемой мокроты после пробы ИГХВ. В нейтрофилах мокроты цитохимическими методами выявляли активность кислой (КФ) и щелочной (ЩФ) фосфатаз, аденозинтрифосфатазы (АТФазы). Оценку реакции на активность гидролаз проводили полуколичественным методом Капlou с распределением клеток по группам в зависимости от интенсивности окраски продукта, образующегося при взаимодействии фермента с субстратом, и последующим расчетом среднего цитохимического индекса (СЦИ) ферментативной активности. **Результаты.** Исходное значение $ОФВ_1$ составило в среднем $97,9 \pm 5,3\%$, $\Delta ОФВ_1$ ИГХВ $-2,0$ ($-8,0$; $2,0$)%. Под воздействием холодового стимула на фоне смешанного паттерна воспаления бронхов у пациентов регистрировались: повышение СЦИ КФ нейтрофилов (с $1,11 \pm 0,06$ до $1,42 \pm 0,06$; $p < 0,01$), увеличение количества клеток со средней степенью активности КФ (с $23,4 \pm 1,94$ до $40,1 \pm 4,30\%$; $p < 0,01$) и уменьшение числа клеток с отрицательной реакцией на КФ (с $15,1 \pm 3,58$ до $5,2 \pm 2,78\%$; $p < 0,05$), тенденция к увеличению числа нейтрофилов с высокой степенью активности АТФазы (с $3,50 \pm 2,70$ до $7,22 \pm 2,64\%$) и ЩФ (с $13,7 \pm 4,22$ до $15,7 \pm 3,46\%$). **Заключение.** Активация КФ нейтрофилов при холод-индуцированном стрессе свидетельствует о возможности увеличения кислотности среды интерстиция, стимуляции повреждения и уязвимости к холодовому воздействию десмо-эпителиального барьера бронхов и расценивается в качестве критерия высокого риска развития холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных БА со смешанным фенотипом воспаления.

Ключевые слова: бронхиальная астма, кислая и щелочная фосфатаза, аденозинтрифосфатаза, нейтрофилы в смешанном паттерне воспаления бронхов, холодовое воздействие, холод-индуцированный стресс.

HYDROLYTIC ENZYMES OF AIRWAY NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH ASTHMA UNDER COLD STIMULI EXPOSURE

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

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

SUMMARY. Introduction. The labilization of lysosomal membranes with the release of a wide range of lysosomal enzymes of pro-inflammatory and proapoptotic action, which have a high hydrolytic potential, is one of the essential com-

Контактная информация

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», 675000, Россия, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22. E-mail: dncfpd@dncfpd.ru

Correspondence should be addressed to

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, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: dncfpd@dncfpd.ru

Для цитирования:

Пирогов А.Б., Андриевская И.А., Приходько А.Г., Перельман Ю.М. Гидролитические ферменты нейтрофильных гранулоцитов дыхательных путей у больных бронхиальной астмой при воздействии холодового стимула. 2020. Вып.78. С. 56–65. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-56-65

For citation:

Pirogov A.B., Andrievskaya I.A., Prikhodko A.G., Perelman J.M Hydrolytic enzymes of airway neutrophilic granulocytes in patients with asthma under cold stimuli exposure. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* = *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2020; (78):56–65 (in Russian). DOI: 10.36604/1998- 5029-2020-78-56-65

ponents of adaptive changes in cells under stress. The participation of hydrolytic enzymes of phagocytes in cellular reactions of inflammation and adaptation to cold stress in patients with asthma has been little studied. **Aim.** To study the activity of neutrophil hydrolases of bronchi in patients with asthma under cold-induced stress. Materials and methods. In patients with persistent asthma ($n=13$), lung function ($FEV_1, \%$), airway response ($\Delta FEV_{1\text{ IHCA}}, \%$) to standard 3-minute isocapnic hyperventilation with cold air (IHCA) were determined by spirometry. The collection of induced and spontaneously produced sputum after the IHCA was carried out. The activity of acidic (AP) and alkaline (ALP) phosphatases, adenosine triphosphatase (ATPase) was detected in sputum neutrophils by cytochemical methods. The assessment of the reaction to the activity of hydrolases was carried out by the semi-quantitative Kaplow method with the distribution of cells into groups depending on the color intensity of the product formed during the interaction of the enzyme with the substrate, and the subsequent calculation of the average cytochemical index (ACI) of the enzymatic activity. **Results.** The baseline FEV_1 , averaged $97.9 \pm 5.3\%$, $\Delta FEV_{1\text{ IHCA}} -2.0$ ($-8.0; 2.0\%$). Under the influence of a cold stimulus against the background of a mixed pattern of bronchial inflammation in patients, the following was recorded: an increase in the ACI AP of neutrophils (from 1.11 ± 0.06 to 1.42 ± 0.06 ; $p < 0.01$), an increase in the number of cells with an average degree of AP activity (from 23.4 ± 1.94 to $40.1 \pm 4.30\%$; $p < 0.01$) and a decrease in the number of cells with a negative reaction to AP (from 15.1 ± 3.58 to $5.2 \pm 2.78\%$; $p < 0.05$), a tendency to an increase in the number of neutrophils with a high degree of ATPase activity (from 3.50 ± 2.70 to $7.22 \pm 2.64\%$) and ALP (from 13.7 ± 4.22 to $15.7 \pm 3.46\%$). **Conclusion.** The activation of AP of neutrophils under cold-induced stress indicates the possibility of an increase in the acidity of the interstitium, stimulation of damage and vulnerability to cold effects of the desmo-epithelial barrier of the bronchi and is regarded as a criterion for a high risk of cold airway hyperresponsiveness in asthma patients with a mixed inflammation phenotype.

Key words: asthma, acid and alkaline phosphatase, adenosine triphosphatase, neutrophils in a mixed pattern of bronchial inflammation, cold exposure, cold-induced stress.

Воздействие низких температур атмосферного воздуха как экологически обусловленного триггера холодиндуцированного бронхоспазма у больных бронхиальной астмой (БА) связано с развитием клинического синдрома холодовой гиперреактивности дыхательных путей (ХГДП), диагностируемого у большинства (60-80%) пациентов при астме любой степени тяжести [1]. Наряду с другими повреждающими факторами, холодовой стимул является индуктором респираторного оксидативного стресса, инициирующего развитие и прогрессирование различных заболеваний лёгких [2].

Известно, что в качестве одного из существенных компонентов адаптивных изменений клеток при стрессе выступает реакция лизосом, которая проявляется лабильностью мембран и высвобождением широкого спектра лизосомных ферментов провоспалительного и проапоптотического действия, обладающих высоким гидролитическим потенциалом [3, 4]. Другой гранью обусловленного стрессом функционирования лизосом, связанного с экспортом ферментов в результате дестабилизации мембран, является секреция гидролаз в окружающую среду клеток лейкоцитарного ряда, тканевыми макрофагами и иммунными клетками [3]. Так, провоспалительная роль полиморфноядерных лейкоцитов рассматривается в связи с мобилизацией и экзоцитозом внутриклеточных гранул: первичных (азурофильных), маркером которых служат пероксидаза и кислая фосфатаза, и вторичных (специфических), относящихся к источникам щелочной фосфатазы [5].

Как было установлено исследованиями *in vitro*, в условиях длительного холодового воздействия на организм происходит увеличение продуктов гистохимической реакции на щелочную фосфатазу в гранулах

тучных клеток, мигрирующих в просвет трахеи для передачи информационных сигналов стволовым клеткам с целью уменьшения количества малодифференцированных клеточных элементов в трахеальном эпителии [6]. При этом в клетках цилиарного эпителия обнаруживается значительное усиление активности гидролаз: кислой фосфатазы в апикальном, щелочной фосфатазы – в базальном полюсах эпителиоцитов [6]. Высказано предположение о провоцирующем влиянии пролонгированного действия низких температур на развитие глубоких и стойких нарушений гидролитической ферментативной активности в реснитчатом эпителии дыхательных путей вследствие дестабилизации мембран лизосом, что приводит к деструктивным изменениям эпителиальной паренхимы [6].

На основании экспериментальных данных об изменениях активности гидролаз эпителия воздухоносных путей в условиях общего охлаждения организма, закономерно возникает вопрос о возможных преобразованиях уровня гидролитической активности и лизосомного экзоцитоза эффекторов воспаления дыхательных путей под влиянием холода. Речь идет о нейтрофильных гранулоцитах, в качестве представителей популяции профессиональных фагоцитов, индуцирующих посредством респираторного взрыва генерацию активных форм кислорода (АФК) и других медиаторов клеточного окисления, вызывающих экспрессию провоспалительных цитокинов и свободнорадикальное повреждение респираторного тракта [2, 7]. В аспекте морфогенеза холодовой гиперреактивности и воспаления бронхов у больных БА актуальна фундаментальная проблема влияния оксидантов, продуцируемых при холод-индуцированном стрессе, на функциональную, в том числе лизосомную, активность нейтрофилов, формирующих в совокупности с эозинофилами специ-

фический для развития данного вида гиперреактивности воспалительный профиль дыхательных путей.

Цель настоящей работы заключалась в изучении активности гидролитических ферментов (кислой и щелочной фосфатаз, аденозинтрифосфатазы) нейтрофильных гранулоцитов бронхов у больных персистирующей БА при воздействии холодового стимула.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (2000 г.), Правилами клинической практики в Российской Федерации, утверждёнными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003, после экспертной оценки и разрешения комитета по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания (протокол №121 от 25.10.17). Обследование больных проводилось на добровольной основе, после знакомства с дизайном работы и подписания информированного согласия. Набор пациентов осуществлялся в зимний период года.

Исследование носило одномоментный наблюдательный характер. Основными критериями включения больных в исследование были: возраст от 20 до 60 лет; документально подтверждённый клинический диагноз персистирующей БА; объем форсированного выдоха за первую секунду ($ОФВ_1$) на момент тестирования более 70% должной величины; добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие сопутствующей патологии, которая могла повлиять на результаты исследования; наличие острых респираторных заболеваний и обострения БА в течение предшествующих 4 недель.

В исследовании приняли участие 13 больных персистирующей БА неаллергического фенотипа [8], обоих полов (7 женщин, 6 мужчин), средний возраст $47,4 \pm 4,3$ лет. Обследование больных проводилось первую половину дня, по единым стандартам в соответствии с существующими международными протоколами. В день тестирования пациентами до проведения процедур в течение 1,5 часов ограничивался приём горячей пищи и напитков, продуктов, способных повлиять на собираемый биоматериал, запрещалась любая физическая нагрузка, контакт с холодом, аэрополлютантами, изменение местонахождения. Перед тестированием больных просили воздерживаться от приёма бронхолитических препаратов, комбинированных ингаляционных противовоспалительных средств, как минимум за 6-24 часов до предполагаемого тестирования [9, 10].

Дизайн работы предусматривал двухдневное обследование больных с оценкой функции внешнего дыхания, бронхиальной реактивности, особенностей бронхиального воспаления. Первый день исследования

включал последовательно базовую оценку вентиляционной функции лёгких с анализом кривой поток-объем форсированного выдоха ($ОФВ_1$, $ОФВ_1/ЖЕЛ$) при рутинной спирометрии (Easy on PC, ndd Medizintechnik AG, Швейцария), выполнение пробы с β_2 -агонистом короткого действия (сальбутамол, 400 мкг) с целью определения обратимого компонента бронхиальной обструкции (Δ , %); сбор индуцированной мокроты (ИМ) по стандартной методике [11] после ингаляций 3-, 4- и 5%-го раствора хлорида натрия с применением ультразвукового небулайзера (OMRON NE-U-17, Япония) сеансами по 7 минут, под контролем $ОФВ_1$ после каждой провокации. На следующий день проводилась 3-минутная бронхопровокационная проба путём изокапнической гипервентиляции холодным воздухом (-20°C) (ИГХВ) под контролем спирометрии [1], после которой осуществлялся сбор образцов спонтанно продуцируемой мокроты.

Цитологическое исследование мокроты проводили в тот же день не позднее 2 часов после ее получения. В камере Горяева оценивали количество клеток в единице нативного материала мокроты стандартным методом. Для уточнения клеточного состава 50 мкл мокроты наносили на нагретые до температуры 37°C предметные стекла. Цитологические мазки изготавливались стандартным методом Кост и высушивались на воздухе в течение 5-10 минут при температуре 37°C в вентилируемом термостате ТМ-2. После фиксации (10 мин) в парах 40% раствора формалина мазки окрашивались 4-5% водным красителем Романовского-Гимза при pH 6,8. Клеточный состав в мазках мокроты изучали при помощи светооптической иммерсионной микроскопии, с подсчетом не менее 400 клеток в 100 полях зрения, в центральных и периферических частях препарата. Число найденных клеток выражали в процентах [11].

Для светооптического изучения в мазках мокроты реакции нейтрофильных гранулоцитов на гидролазы (кислую и щелочную фосфатазы, аденозинтрифосфатазу) окрашивание стёкол выполняли на термостоліке (37°C). Необходимый краситель наносили непосредственно на фиксированные (5 мин) в парах формалина мазки в объёме, покрывающем весь мазок, затем оставляли на 30-35 минут, после чего дважды промывали дистиллированной водой. При подготовке мазков для исследования кислой фосфатазы мазки дополнительно (2-5 сек) обрабатывали 0,5% сульфидом натрия, затем дважды промывали дистиллированной водой. Для выявления реакции клеток на кислую фосфатазу (КФ) применяли сульфидный метод Гомори (pH инкубационного раствора 5,0), для выявления реакции клеток на щелочную фосфатазу (ЩФ) использовали метод Берстона (pH инкубационного раствора 8,5). В обоих случаях ядра клеток докрасивали 0,1% водным раствором сафранина. Для выявления реакции нейтрофильных гранулоцитов на аденозинтрифосфатазу (АТФазу) использовали метод Вахштейна-Мейзеля (pH

инкубационного раствора 7,2) с докрашиванием ядер клеток толуидиновым синим [12, 13].

Оценку реакции на активность КФ, ЩФ, АТФазы в нейтрофильных гранулоцитах мокроты проводили полуколичественным методом Каплю с распределением клеток по группам в зависимости от интенсивности маркирующей активности фермента окраски продукта, образующегося в цитоплазме при взаимодействии фермента с субстратом. В 0 группу включали клетки без гранул, в I группу – клетки с низкой степенью активности фермента, содержащие единичные гранулы (площадь специфической окраски и заполнение цитоплазмы гранулами до 25% цитоплазмы), во II группу – клетки со средней степенью активности фермента (площадь окраски и заполнение цитоплазмы гранулами 30-70%), в III группу – клетки с высокой степенью активности фермента (площадь окраски и заполнение цитоплазмы гранулами 70-100%) с экзоцитозом гранул и гранулярного содержимого. Путем световой микроскопии в мазке подсчитывали 100 нейтрофилов, дифференцируя клетки по уровню окраски. Средний цитохимический индекс (СЦИ, в условных единицах) рассчитывали по формуле: $СЦИ = (0 \times N_0 + 1 \times N_I + 2 \times N_{II} + 3 \times N_{III}) / 100$, где N_0 , N_I , N_{II} , N_{III} – число нейтрофилов соответствующей группы.

Статистический анализ полученного материала проводили на основе стандартных методов вариационной статистики с использованием программы «Автоматизированная система диспансеризации» [14]. Оценку соответствия признака закону нормального распределения проводили при помощи критериев Колмогорова-Смирнова, Пирсона-Мизеса. При нормальном типе распределения использовали парный критерий t (Стьюдента), при распределении данных, отличном от нормального, применяли парный крите-

рий Уилкоксона. Описательная статистика количественных признаков представлена с помощью средней арифметической, стандартной ошибки средней арифметической ($M \pm m$), а также медианы и квартилей (Me (Q_1 ; Q_3)). Для всех величин принимались во внимание уровень статистической достоверности различий (p) менее 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

На момент тестирования все больные имели стабильное течение болезни по данным вопросника Asthma Control Test (АСТ > 19 баллов). Полученные при спирометрическом исследовании исходные значения параметров вентиляционной функции легких составили в среднем по группе для ОФВ₁ 97,9±5,3%, ОФВ₁/ЖЕЛ 73,3±2,6%. Прирост ОФВ₁ (%) в ответ на введение короткодействующего β_2 -агониста варьировал в пределах 6,5 (3,09; 16,0), что допускало проведение сбора ИМ и выполнение бронхопровокационной пробы ИГХВ. Все больные адекватно перенесли индукцию солевыми растворами, острую холодовую бронхопровокацию и находились не менее 1 часа под контролем медицинского персонала после выполненного тестирования. Изменение ОФВ₁ (Δ , %) после пробы ИГХВ составило -2,0 (-8,0; 2,0) %.

В цитограммах мокроты больных после ИГХВ отмечались существенные сдвиги. Так, в ответ на ингаляцию холодного воздуха наблюдалось увеличение цитоза, значимо возрастало количество эозинофилов и лимфоцитов (табл. 1). Содержание эпителиоцитов в мокроте достоверно уменьшалось (табл. 1), что указывало на развитие индикатора ремоделирования бронхов – эпителиальной деструкции, стимулированной холоду- индуцированным стрессом.

Таблица 1

Динамика цитоза и клеточного состава мокроты в ответ на холодовую бронхопровокацию ($M \pm m$)

Показатели	Исходные	После пробы ИГХВ	p
Цитоз (количество клеток/1 мкл)	1,5±0,17	2,2±0,22	<0,05
Нейтрофилы, %	47,6±2,92	42,3±3,83	>0,05
Макрофаги, %	36,8±2,78	43,8±2,71	>0,05
Эозинофилы, %	1,88±0,33	7,8±2,70	<0,05
Лимфоциты, %	2,8±0,24	1,2±0,21	<0,001
Эпителиоциты, %	11,6±1,67	4,6±2,10	<0,05

Вариант деструкции бронхиального эпителия – источника уменьшения числа структурно целостных клеток, найденных в ИМ, может быть охарактеризован как достаточно активный ввиду выявленных особенностей воспалительного паттерна дыхательных путей исследуемых больных. Поскольку в мокроте больных было обнаружено $\geq 2\%$ эозинофилов и $\geq 40\%$ нейтрофилов, паттерн воспаления был отнесен к смешанному [15], характеризующемуся выраженной пероксидазной активностью лизосом, высокими показателями деструк-

ции и цитолиза пула нейтрофилов [16].

Смешанный паттерн воспаления ассоциируется с высокой степенью эпителиальной деструкции, оказывающей негативное влияние на проходимость дыхательных путей и клинические проявления астмы, и расценивается в качестве неблагоприятного прогностического фактора течения болезни [17]. Больные со смешанным фенотипом БА, несмотря на получаемую базисную терапию ингаляционными глюкокортикостероидами, чаще, чем лица, имеющие эозинофильный

паттерн воспаления бронхов, испытывают дыхательный дискомфорт и потребность в использовании препаратов неотложной помощи, что находит отражение в более низких значениях ОФВ₁ и МОС₂₅₋₇₅, более значимом приросте ОФВ₁ в ответ на пробу с β_2 -агонистом и усиленной бронхоконстрикторной реакции на ингаляцию холодного воздуха [18]. Нейтрофилия бронхиального инфильтрата, как правило, сопутствует развитию ХГДП. Частота встречаемости лиц с ХГДП среди больных со смешанным воспалительным паттерном достоверно выше, чем среди пациентов, характеризующихся эозинофилией бронхиального воспаления (51,4 и 28,6%, $\chi^2=6,15$; $p<0,05$, соответственно). В соответствии с данными Asthma Control Test, смешанный паттерн воспаления у больных легкой БА сочетается с низким уровнем контроля и более частыми обострениями болезни [18].

Следует заметить, что экспортируемая нейтрофилами генерация АФК рассматривается в качестве причины свободнорадикального повреждения крист митохондрий и разрушения эндоплазматического ретикулула бронхиального эпителия с последующей гибелью клеток [19]. Предполагается, что в этом случае сигналы апоптоза передаются в эпителий не по прямому пути, от лигирования рецептора смерти до активации каспазного каскада и гибели клеток, а по пути, опосредованному дезэнергизацией эпителиоцитов [19]. Дисфункция эпителия, активно развивающаяся при БА, связывается с низким уровнем экспрессии факторов антиоксидантной защиты, в частности, супер-

оксиддисмутазы, способствующим увеличению восприимчивости эпителиальных клеток к агрессивному действию оксидантов [20].

Так как в мокроте исследуемых больных были отмечены признаки существенной деструкции эпителия, то изменения активности гидролаз нейтрофильных гранулоцитов могли бы служить свидетельством причастности гидролитических ферментов, секретируемых в интерстиций бронхов нейтрофилами, к дезорганизации и разрушению бронхиальной паренхимы путём потенцирования процессов трансформирования и дезэнергизации паренхиматозных клеток-мишеней. Действительно, в ответ на пробу ИГХВ у пациентов наблюдалось повышение СЦИ главного фермента лизосом нейтрофилов – КФ (табл. 2). В мокроте статистически значимо увеличивалось количество нейтрофилов со средней степенью активности фермента, у которых площадь окраски и заполнение цитоплазмы гранулами составляли 30-70% (НП, рис. 1), и уменьшалось количество клеток, у которых не обнаруживалось гранул с маркирующим активностью КФ продуктом (Н0) (табл. 2). Величины СЦИ лизосомной АТФазы и СЦИ ЩФ нейтрофилов после проведения ИГХВ достоверно не изменялись (табл. 2). Однако если принять во внимание тенденцию к увеличению содержания в мокроте дегранулирующих нейтрофилов с высокой активностью АТФазы и ЩФ (рис. 2, 3), вероятно участие данных ферментов в персистенции воспаления при холодовом стрессе.

Таблица 2

Средний цитохимический индекс кислой и щелочной фосфатазы, аденозинтрифосфатазы и количество нейтрофильных гранулоцитов с разной степенью активности ферментов в мокроте больных БА ($M \pm m$)

Показатели	Исходные	После пробы ИГХВ	p
<i>Кислая фосфатаза</i>			
Н0, %	15,1 \pm 3,58	5,2 \pm 2,78	<0,05
Н1, %	53,6 \pm 4,13	45,2 \pm 7,1	>0,05
НП, %	23,4 \pm 1,94	40,1 \pm 4,3	<0,01
НПП, %	4,1 \pm 1,38	9,0 \pm 2,95	>0,05
СЦИ, у.е.	1,11 \pm 0,06	1,42 \pm 0,06	<0,01
<i>Щелочная фосфатаза</i>			
Н0, %	3,2 \pm 1,37	4,9 \pm 4,9	>0,05
Н1, %	39,4 \pm 4,8	46,3 \pm 3,85	>0,05
НП, %	43,7 \pm 4,57	38,3 \pm 4,24	>0,05
НПП, %	13,7 \pm 4,22	15,7 \pm 3,46	>0,05
СЦИ, у.е.	1,68 \pm 0,09	1,69 \pm 0,06	>0,05
<i>Аденозинтрифосфатаза</i>			
Н0, %	15,0 \pm 3,57	19,0 \pm 5,11	>0,05
Н1, %	50,9 \pm 5,23	42,2 \pm 4,34	>0,05
НП, %	32,2 \pm 3,78	32,1 \pm 2,18	>0,05
НПП, %	3,50 \pm 2,7	7,22 \pm 2,64	>0,05
СЦИ, у.е.	1,22 \pm 0,06	1,28 \pm 0,09	>0,05

Примечание: СЦИ (в условных единицах) – средний цитохимический индекс. Н0, Н1, НП, НПП – нейтрофильные гранулоциты соответствующей группы (в %).

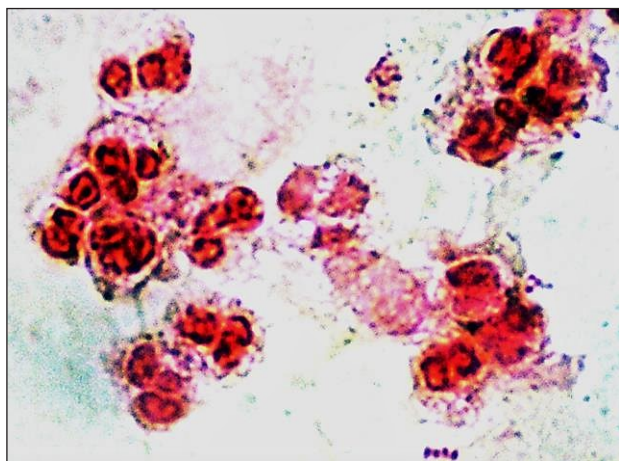


Рис. 1. Продукт реакции на кислую фосфатазу в цитоплазме нейтрофильных гранулоцитов маркирован гранулами чёрного цвета. В мазке мокроты больного БА после пробы ИГХВ видно преобладание клеток со средней степенью активности фермента. Реакция на кислую фосфатазу по Гомори, с докраской сафранином. Увеличение $\times 100$.

В соответствии с литературными сведениями о роли гидролитических ферментов в развитии неспецифических воспалительных заболеваний легких, кислые гидролазы лейкоцитов определяют деструктивный процесс в легких и характеризуют уровень лёгочной деструкции [5]. На фоне повышения активности КФ (при хроническом бронхите на 29,0 %, острой пневмонии – на 37,1%, БА смешанного генеза – на 32,6 %) к ключевым моментам реализации провоспалительной функции лейкоцитов относят мобилизацию и экзоцитоз во внеклеточное пространство цитоплазматических гранул, содержащих ферменты [5].

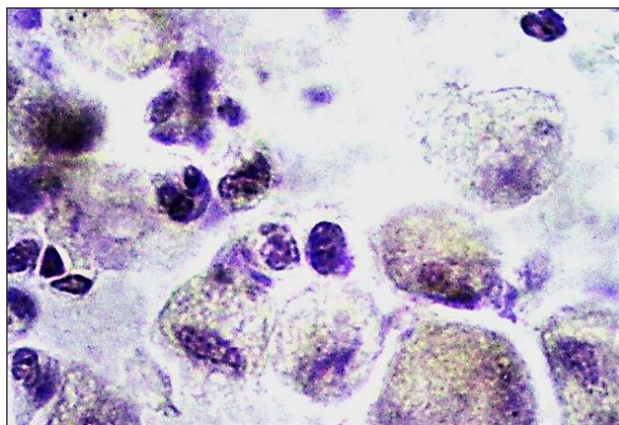


Рис. 2. Высокая активность аденозинтрифосфатазы нейтрофильных гранулоцитов в мазке мокроты больного БА после пробы ИГХВ. Продукт реакции на аденозинтрифосфатазу выявляется в виде гранул коричнево-черного цвета, локализованных в цитоплазме нейтрофилов, и вне клеток, снаружи от цитоплазматической мембраны как результат дегрануляции. Реакция на аденозинтрифосфатазу по методу Вах-

штейна-Мейзеля, с докраской ядер толуидиновым синим. Увеличение $\times 100$.

Исходя из концепции секреции гидролаз при эскалации повреждения и воспаления бронхолегочной ткани, прослеживаемая в дыхательных путях исследуемых больных в ответ на холодовое воздействие, тенденция к снижению количества нейтрофилов со слабopоложительной и положительной (низкой и средней степенью ферментативной активности) реакцией на гидролазы (НП для КФ, НП для ЩФ, НН для АТФазы, табл. 2) скорее всего связана с опустошением ферментативного запаса в гранулах на фоне усиленной дегрануляции и расходования гидролитических ферментов клетками. Уменьшение количества нейтрофилов может быть обусловлено также клеточной гибелью, наступающей в условиях холод-индуцированного стресса вследствие повреждения мембран лизосом, изолирующих гидролитические ферменты, имеющие оптимум действия в кислой среде.

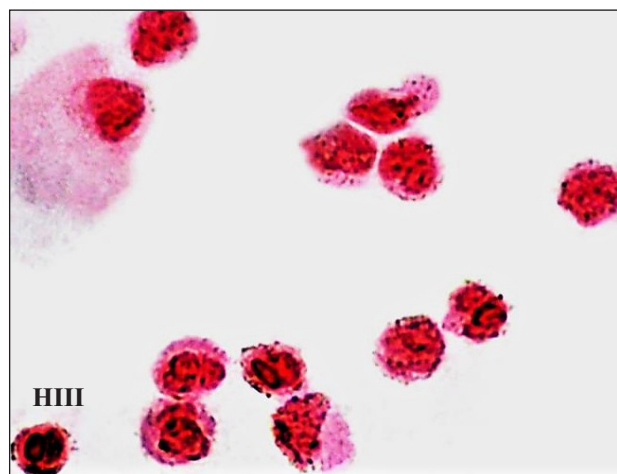


Рис. 3. Продукт реакции на щелочную фосфатазу в цитоплазме нейтрофильных гранулоцитов маркирован гранулами темно-синего цвета. Количество и интенсивность окраски цитоплазматических гранул нейтрофилов в мазке мокроты больного БА после пробы ИГХВ варьируют. Выявлены клетки с низкой и средней степенью активности фермента и нейтрофил с высокой активностью фермента (ННП). Реакция на щелочную фосфатазу по Берстону, с докраской сафранином. Увеличение $\times 100$.

Из-за нарушения проницаемости и повреждения лизосомных мембран происходит «закисление» цитоплазмы нейтрофилов, высвобождаются кислые гидролазы, что вызывает запуск процессов апоптоза [4]. Лабильность мембран лизосом с последующей «утечкой» лизосомных гидролаз в цитозоль и индукцией апоптоза сопряжена со стрессорным воздействием окислителей и стимуляцией процессов перекисного окисления липидов в клетках [3, 18]. По мнению ряда авторов, ограниченное повреждение лизосом при слабо выраженном окислительном стрессе индуцирует апоптоз, между тем как выраженное повреждение ли-

зосом приводит к клеточному некрозу [21]. Частичный разрыв лизосомы трактуется в качестве раннего события апоптоза, в то время как в результате молниеносного разрыва органеллы возникает некроз [22]. Можно предположить, что снижение у исследуемых пациентов количества нейтрофилов, характеризующихся положительной реакцией на ЩФ (НП для ЩФ), связано со стимуляцией холодным стрессом трансмембранного переноса оксидантов с последующей утилизацией активированной ЩФ, индукцией перекисного окисления липидов и апоптоза.

Таким образом, отсутствие очевидной реакции бронхов больных БА на холодовой стимул не исключает изменения активности синтезируемых и секретируемых нейтрофилами гидролитических ферментов. Стимуляция активности гидролаз обусловлена холод-индуцированным стрессом, развивающимся в дыхательных путях независимо от манифестации ХГДП под воздействием холодowego триггера, который, в свою очередь, является индуктором респираторного взрыва нейтрофилов с последующим свободно-радикальным повреждением, деструкцией и перестройкой бронхиального эпителия, приводящими к ремоделированию бронхов.

Обнаруженный у исследуемых пациентов смешанный паттерн воспаления дыхательных путей сопряжен с эпителиальной дисфункцией – следствием усиленной деструкции эпителия, а также генерации АФК, провоспалительных цитокинов и ферментов нейтрофилами, подвергающимися дегрануляции и деструкции. В отличие от дегрануляции, при которой в межклеточное пространство секретируются преимущественно сохранившие структуру гранулы с депонированными в них ферментами, при деструкции нейтрофилов происходит лабильная мембран лизосом и во внешнюю среду проникает лизосомный матрикс. Так как смешанный фенотип ассоциирован с гиперреактивностью бронхов астматиков к холодовому стимулу, выявленная в нейтрофилах смешанного воспалительного паттерна бронхов больных БА активация кислых гидролаз (КФ нейтрофилов), инициирующих клеточное повреждение и поддерживающих воспаление за счет повышения кислотности среды интерстиция, может служить критерием воспалительной персистенции и высокого риска развития у таких пациентов ХГДП.

Ограничения настоящего исследования связаны с небольшим количеством больных в анализируемой выборке. Полученные результаты дают предварительное

представление о происходящих изменениях в нейтрофилах после воздействия холода у больных БА. Участие нейтрофильных гранулоцитов в утяжелении астмы носит дискуссионный характер, в том числе их роль при холодовом стрессе и формировании бронхоспазма под воздействием холода, механизмы которого до настоящего времени обсуждаются. Дополнительной сложностью в данной работе являлось получение удовлетворительных образцов биологического материала у больных БА с нетяжелым течением болезни вне обострения. Несомненно, инвазивный забор бронхоальвеолярной жидкости более точно отражал бы характер воспаления дыхательных путей и его особенности после ингаляции холодного воздуха.

Заключение

Воздействие холодowego стимула на дыхательные пути больных персистирующей БА сопровождается изменением активности гидролитических ферментов нейтрофилов в смешанном паттерне воспаления. Повышение активности нейтрофильной кислой фосфатазы, индуцированное холодным стрессом и способствующее поддержанию бронхиального воспаления, свидетельствует о возможности увеличения кислотности интерстициальной среды, стимуляции повреждения клеток и уязвимости десмо-эпителиального барьера бронхов по отношению к действию холодowego триггера. Активация кислой фосфатазы у больных персистирующей БА со смешанным воспалительным фенотипом может служить критерием высокого риска развития ХГДП.

Благодарность

Авторы выражают благодарность кандидату медицинских наук Пироговой Наталье Алексеевне за помощь в анализе цитологического материала

Acknowledgment

The authors are grateful to Natalia A. Pirogova for the help in the analysis of cytological material

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. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П. Гиперреактивность дыхательных путей. Владивосток: Дальнаука, 2011. 204 с. ISBN 978-5-8044-1220-4
2. Соодаева С.К. Свободнорадикальные механизмы повреждения при болезнях органов дыхания // Пульмонология. 2012. Т.22, №1. С.5–10. doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-1-5-10
3. Пупышев А.Б. Лизосомы человека: библиометрическая оценка актуальных направлений исследований // Бюллетень СО РАМН. 2006. Т.26, №1. С.106–116.
4. Пупышев А.Б. Пермеабильность лизосомных мембран как апоптогенный фактор // Цитология. 2011. Т.53,

№4. С.313–324.

5. Федотова Г.Г., Киселева Р.Е. Изменение активности щелочной и кислой фосфатазы лейкоцитов в развитии неспецифического воспаления в лёгких // Современные наукоёмкие технологии. 2007. №1. С.91–92. URL: <http://www.top-technologies.ru/ru/article/view?id=24106>

6. Целуйко С.С., Красавина Н.П. Гистохимическая локализация кислой и щелочной фосфатаз в эпителии трахей при холодовом воздействии // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2017. Вып.66. С.34–40. https://doi.org/10.12737/article_5a1f7327d79570.66878052

7. Соодаева С.К., Климанов И.А. Нарушения окислительного метаболизма при заболеваниях респираторного тракта и современные подходы к антиоксидантной терапии // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2009. №1. С.34–38.

8. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Updated 2020). URL: <http://www.ginasthma.com>

9. Sylvester K.P., Clayton N., Cliff I., Hepple M., Kendrick A., Kirkby J., Miller M., Moore A., Rafferty G.F., O'Reilly L., Shakespeare J., Smith L., Watts T., Bucknall M., Butterfield K. ARTP statement on pulmonary function testing 2020 // BMJ Open Respir. Res. 2020. Vol.7, №1. e000575. doi: 10.1136/bmjresp-2020-000575

10. Pellegrino R., Viegi G., Brusasco V., Crapo R.O., Burgos F., Casaburi R., Coates A., Van der Grinten C.P.M., Gustafsson P., Hankinson J., Jensen R., Johnson D.C., MacIntyre N., McKay R., Miller M.R., Navajas D., Pedersen O.F., Wanger J. Interpretative strategies for lung function tests. Eur. Respir. J. 2005; 26(5):948–968. doi: 10.1183/09031936.05.00035205

11. 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

12. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. Учебник. М.: Медицина, 1982. 304 с.

13. Лойда З., Госсрай Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы: пер. с англ. М.: Мир, 1982. 272 с.

14. Ульянычев Н.В. Системность научных исследований в медицине. Saarbrücken: LAP LAMBERT, 2014. 140 с.

15. Hastie A.T., Moore W.C., Meyers D.A., Vestal P.L., Li H., Peters S.P., Bleecker E.R. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes // J. Allergy Clin. Immunol. 2010. Vol.125, №5. P.1028–1036. doi: 10.1016/j.jaci.2010.02.008

16. Пирогов А.Б., Колосов В.П., Перельман Ю.М., Приходько А.Г., Зиновьев С.В., Гассан Д.А., Мальцева Т.А. Особенности воспалительных паттернов бронхов и клинично-функциональная характеристика тяжелой неконтролируемой астмы у больных с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей // Пульмонология. 2016. Т.26, №6. С.701–707. doi:10.18093/086901892016266701707

17. 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

18. Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Ульянычев Н.В. Профиль воспаления бронхов и особенности течения лёгкой бронхиальной астмы // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2018. Вып.70. С.8–14. doi: 10.12737/article_5c1261aede84.535698460

19. Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling // Cell. Mol. Immunol. 2007. Vol.4, №6. P.419–429.

20. Конищева А.Ю., Гервазиева 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

21. Brunk U.T., Neuzil J., Eaton J.W. Lysosomal involvement in apoptosis // Redox Rep. 2001. Vol.6, №2. P.91–97. doi: 10.1179/135100001101536094

22. Terman A., Kurz T., Gustafsson B., Brunk U.T. Lysosomal labilization // IUBMB Life. 2006. Vol.58, №9. P.531–539. doi: 10.1080/15216540600904885

REFERENCES

1. Prikhodko A.G., Perelman J.M., Kolosov V.P. Airway hyperresponsiveness. Vladivostok: Dal'nauka; 2011 (in Russian). ISBN 978-5-8044-1220-4

2. Soodaeva S.K. Free radical mechanisms of injury in respiratory disease. *Pulmonologiya* 2012; 22(1):5–10 (in Russian). doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-1-5-10

3. Pupyshev A.B. Human lysosomology: bibliometric estimation of frequency of publications in various research directions. *Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (Siberian Scientific Medical Journal)* 2006;

26(1):106–116 (in Russian).

4. Pupyshev A.B. Lysosomal membrane permeabilization as apoptogenic factor. *Tsitologiya* 2011; 53(4):313–324 (in Russian).

5. Fedotova G.G., Kiseleva R.E. Changes in the activity of alkaline and acid phosphatase of leukocytes in the development of nonspecific inflammation in the lungs. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii=Modern high technologies* 2007; (1):91–92 (in Russian). Available at: <http://www.top-technologies.ru/ru/article/view?id=24106>

6. Tseluyko S.S., Krasavina N.P. Histochemical localization of acid and alkaline phosphatase in trachea epithelium at cold exposure. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ=Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2017; (66):34–40 (in Russian). https://doi.org/10.12737/article_5a1f7327d79570.6687805

7. Soodaeva S.K., Klimanov I.A. Disorders of oxidative metabolism in respiratory diseases and modern approaches to antioxidant therapy. *Atmosfera. Pul'monologiya i allergologiya* 2009; (1):34–38 (in Russian).

8. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Updated 2020). Available at: <http://www.ginasthma.com>.

9. Sylvester K.P., Clayton N., Cliff I., Hepple M., Kendrick A., Kirkby J., Miller M., Moore A., Rafferty G.F., O'Reilly L., Shakespeare J., Smith L., Watts T., Bucknall M., Butterfield K. ARTP statement on pulmonary function testing 2020. *BMJ Open Respir. Res.* 2020; 7(1):e000575. doi: 10.1136/bmjresp-2020-000575

10. Pellegrino R., Viegi G., Brusasco V., Crapo R.O., Burgos F., Casaburi R., Coates A., Van der Grinten C.P.M., Gustafsson P., Hankinson J., Jensen R., Johnson D.C., MacIntyre N., McKay R., Miller M.R., Navajas D., Pedersen O.F., Wanger J. Interpretative strategies for lung function tests // *Eur. Respir. J.* 2005. Vol.26, №5. P.948–968. doi: 10.1183/09031936.05.00035205

11. 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

12. Volkova O.V., Eletskiy Yu.K. Basics of histology with histological technique (Textbook). Moscow: Meditsina; 1982 (in Russian)

13. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T.H. Enzyme histochemistry: a laboratory manual. Moscow: Mir; 1982 (in Russian).

14. Ul'yanychev N.V. Systematic research in medicine. Saarbrücken: LAP LAMBERT; 2014 (in Russian).

15. Hastie A.T., Moore W.C., Meyers D.A., Vestal P.L., Li H., Peters S.P., Bleecker E.R. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125(5):1028–1036. doi: 10.1016/j.jaci.2010.02.008

16. Pirogov A.B., Kolosov V.P., Perel'man Y.M., Prihod'ko A.G., Zinov'ev S.V., Gassan D.A., Mal'tseva T.A. Airway inflammation patterns and clinical and functional features in patients with severe uncontrolled asthma and cold-induced airway hyperresponsiveness. *Pulmonologiya* 2016; 26(6):701–707 (in Russian). doi: 10.18093/086901892016266701707

17. Pirogov A.B., Gassan D.A., Zinov'ev S.S., Prihod'ko 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

18. Pirogov A.B., Perelman J.M., Prihod'ko A.G., Ul'yanychev N.V. Profile of bronchial inflammation and clinical features of mild bronchial asthma. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ=Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2018; (70):8–14 (in Russian). doi: 10.12737/article_5c1261aede84.535698460

19. Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling. *Cell. Mol. Immunol.* 2007; 4(6):419–429.

20. 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

21. Brunk U.T., Neuzil J., Eaton J.W. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep.* 2001; 6(2): 91–97. doi: 10.1179/135100001101536094

22. Terman A., Kurz T., Gustafsson B., Brunk U.T. Lysosomal labilization. *IUBMB Life* 2006; 58(9):531–539. doi: 10.1080/15216540600904885

Информация об авторах:

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

Author information:

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

Ирина Анатольевна Андриевская, д-р биол. наук, профессор РАН, зав. лабораторией механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: irina-andrievskaja@rambler.ru

Irina A. Andrievskaya, PhD, D.Sc. (Biol.), Professor of RAS, Head of Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery Processes of the Respiratory System at Non-Specific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: irina-andrievskaja@rambler.ru

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

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

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

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 17.11.2020
Принята к печати 30.11.2020*

*Received November 17, 2020
Accepted November 30, 2020*