

УДК 616.248-001.19-08:615.234

DOI: 10.12737/19935

ДИНАМИКА ВОСПАЛИТЕЛЬНО-КЛЕТОЧНОГО ПРОФИЛЯ ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЫ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С ХОЛОДОВОЙ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬЮ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ БАЗИСНОЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

А.Б.Пирогов¹, А.Г.Приходько¹, Ю.М.Перельман¹, С.В.Зиновьев²

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

²Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95

РЕЗЮМЕ

Характер изменений воспалительно-клеточного паттерна бронхиального секрета у больных бронхиальной астмой (БА) в ассоциации с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей (ХГДП) под воздействием стандартной терапии мало исследован. Целью настоящей работы явилось изучение динамики клеточного профиля, нейтрофильного компонента воспаления бронхов при комбинированной терапии больных БА с ХГДП. У 12 больных БА с ХГДП изучались количество клеток индуцированной мокроты (ИМ), пероксидазная, цитолитическая и деструктивная активность эозинофилов и нейтрофилов в мокроте, функция внешнего дыхания и контроль над заболеванием при помощи вопросника Asthma Control Test (ACT) исходно и через 48 недель после терапии комбинированным препаратом будесонид/формотерол. Исходно больные имели низкий уровень контроля над заболеванием по вопроснику ACT (14,4±1,2 баллов), ОФВ₁ составлял 87,4±3,3% от должных величин, в ИМ преобладали нейтрофилы (26,4±1,7%) над эозинофилами (18,5±2,6%), уровень миелопероксидазы (средний цитохимический коэффициент) составил 65,9±5,4 пикселей. Через 48 недель наблюдения только у 58% пациентов были достигнуты критерии хорошего контроля астмы и улучшение функции внешнего дыхания. В ИМ отмечалось достоверное снижение содержания эозинофилов (11,4±3,2%; $p=0,045$), уменьшилась интенсивность цитолиза эозинофилов и нейтрофилов, возросла внутриклеточная концентрация миелопероксидазы (98,2±14,1 пикселей; $p=0,0637$), регистрировались деструктивные изменения в гранулоцитах, однако количество нейтрофилов (34,0±8,2%, $p=0,34$) оставалось высоким, что было расценено как фактор устойчивой инициации воспаления и оксидативного стресса. Таким образом, использование режима противовоспалительной терапии длительностью 48 недель с применением комбинированного препарата будесонид/формотерол, ориентированное на достижение клинических критериев контроля над астмой у больных с ХГДП, не позволяет достигнуть коррекции нейтрофильного звена воспаления. Количественный показатель нейтрофилов в ИМ у таких больных имеет прогностическое значение для воз-

можной утраты достигнутого контроля над болезнью.

Ключевые слова: воспаление, бронхиальная астма, холодовая гиперреактивность дыхательных путей, лечение, контроль, нейтрофильный компонент воспаления бронхов, будесонид/формотерол.

SUMMARY

DYNAMICS OF INFLAMMATORY-CELLULAR PROFILE OF THE INDUCED SPUTUM IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA AND COLD AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS UNDER BASIC ANTI-INFLAMMATORY THERAPY

A.B.Pirogov¹, A.G.Prikhodko¹, J.M.Perelman¹, S.V.Zinov'ev²

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 character of changes of inflammatory-cellular pattern of bronchial secretion in patients with asthma in association with cold airway hyperresponsiveness (CAHR) under the influence of standard therapy has been studied little. The aim of the present work is to study dynamics of cellular profile, neutrophilic component of bronchial inflammation under the combination therapy of asthmatics with CAHR. 12 asthma patients with CAHR were studied upon the number of cells of the induced sputum (IS), peroxidase, cytolytic and destructive activity of eosinophils and neutrophils in the sputum, lung function and asthma control with the help of questionnaire Asthma Control Test (ACT) before and after the therapy with the combination of budesonide/formoterol. Before the therapy the patients had a low level of asthma control (14.4±1.2 points of ACT), FEV₁ was 87.4±3.3% from predicted values; in IS neutrophils prevailed (26.4±1.7%) over eosinophils (18.5±2.6%); the level of myeloperoxidase (mean cytochemical coefficient) was 65.9±5.4 pixels. After 48 weeks of the observation only in 58% of patients the criteria of good control of asthma and the improvement of lung function were achieved. In IS there was a decrease of eosinophils (11.4±3.2%; $p=0.045$); the inten-

siveness of eosinophils and neutrophils cytolysis dropped; intracellular concentration of myeloperoxidase grew (98.2 ± 14.1 pixels; $p=0.0637$); destructive changes in granulocytes were registered but the number of neutrophils remained high ($34.0 \pm 8.2\%$, $p=0.34$), which was considered as the factor of stable initiation of inflammation and oxidative stress. Thus, the use of anti-inflammatory treatment regime lasting 48 weeks with combination of budesonide/formoterol oriented to achieve clinical criteria of asthma control in patients with CAHR does not allow to achieve correction of the level of neutrophilic inflammatory component. Quantitative index of neutrophils in IS in these patients has prognostic value for the possible loss of achieved asthma control.

Key words: inflammation, asthma, cold airway hyper-responsiveness, treatment, control, neutrophilic component of bronchial inflammation, budesonide/formoterol.

Известно, что холододовая гиперреактивность дыхательных путей (ХГДП) у больных бронхиальной астмой (БА) ассоциируется с низким уровнем контроля болезни и трудностями купирования преходящего холододового бронхоспазма [4, 14, 24, 26] в интеграции с особым ферментативно-метаболическим статусом аккумулярованных в бронхах гранулоцитарных эффекторов воспаления [10]. Персистирующий воспалительный процесс у больных БА с ХГДП характеризуется смешанным нейтрофильно-эозинофильным паттерном [13, 26] и высоким уровнем активности окислительного фермента гранулоцитов – миелопероксидазы (МПО) [10]. МПО при взаимодействии с H_2O_2 катализирует продукцию высоко реакционноспособных галогенсодержащих соединений, которые модифицируют функциональные группы белков, липидов, гликопротеинов, нуклеиновых кислот и других органических молекул, что обеспечивает функциональную связь между галогенирующим и оксидативным стрессом [8, 9]. Образование активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ) обусловлено синтезом МПО, депонированной в азурофильных гранулах и секретлируемой в экстрацеллюлярный матрикс при дегрануляции, способствует эффективной индукции лейкоцитами воспалительного повреждения тканей [8, 9, 23].

В связи с существенной долей нейтрофильного компонента в структуре клеточного воспаления у больных БА с ХГДП заслуживает особого внимание проблема праймирующих (англ. *priming* – подготовка) агентов, которые способны усилить функциональную активность нейтрофилов. Оксидантные реакции этих клеток, в первую очередь отвечающие на действие экзогенных и эндогенных триггеров респираторным взрывом, существенно зависят от стимула и могут подвергаться деактивации или праймированию, то есть, негативному и позитивному кондиционированию [6]. Элементы деактивации воспроизводятся в опытах с глюкокортикоидами, которые используются с противовоспалительной целью. Праймирование наблюдается при контакте нейтрофилов с цитокинами, ростовыми

факторами, хемокинами, липидными медиаторами, бактериальными полисахаридами [6, 28].

Одним из важнейших механизмов стимуляции респираторного взрыва выступает фосфорилирование оксидазных компонентов нейтрофила, а также активация киназ и гуанозинтрифосфатаз, ответственных за данный процесс [6, 28]. Ключевым участником фосфорилирования является $p47phox$. Считается, что праймирующий эффект определяется частичным фосфорилированием $p47phox$, подготавливающим его к полной активации [20, 21].

Путем фосфорилирования $p47phox$ и повышения экспрессии флавоцитохрома $b558$ нейтрофилы преактивируются провоспалительными праймирующими агентами $TNF-\alpha$, $GM-CSF$ и $IL-18$ [20, 21]. В сборке, обеспечивающей образование АФК и свободных радикалов $NADPH$ -оксидазы, по всей вероятности, участвуют и другие цитокины – $IL-1$, $IL-6$, $IL-8$. Повышенное их содержание отмечается *in vitro*, наряду с увеличенными концентрациями $TNF-\alpha$, $IL-5$, $IL-10$, на фоне значительного роста количества нейтрофилов в дыхательных путях в ответ на действие холододового триггера [19]. Признаки экспрессии цитокинов $Th1$ - и $Th2$ -типов и нейтрофилия лаважной жидкости бронхов зарегистрированы в эксперименте, сочетающем холододовую и физическую нагрузки у лошадей [19]. Они ассоциируются с данными, полученными в аналогичном эксперименте *D.Bedenice et al.* [17], в котором было показано, что нейтрофилия бронхиального инфильтрата тесно взаимосвязана с потенцированием бронхиальной обструкции и гиперчувствительностью бронхов. Ввиду этого авторы пришли к заключению, что нейтрофилы изменяют порог раздражения трахеобронхиальных рецепторов, а нарушение проходимости дыхательных путей корректируется подавлением нейтрофильного компонента воспаления.

Применительно к клинической практике представляется актуальным изучение динамики воспалительно-клеточного профиля бронхиального секрета у больных БА с ХГДП в процессе стандартной терапии. В этой связи наибольший интерес в патогенетическом аспекте вызывает исследование статуса гранулоцитарного сегмента бронхиального инфильтрата, а именно популяции нейтрофилов – звена, наиболее чувствительного к воздействию холододового триггера, подверженного праймированию со стороны цитокинов, ведущего поставщика оксидаз, АФГ, АФК и свободных радикалов – факторов оксидативного стресса и персистенции хронического воспаления.

Целью настоящей работы явилось изучение динамики клеточного профиля, нейтрофильного компонента воспаления бронхов при комбинированной терапии больных БА с ХГДП.

Материалы и методы исследования

В проспективном исследовании приняли участие 12 больных с легкой персистирующей формой БА и наличием доказанной ХГДП, средний возраст $42,4 \pm 2,5$ года, рост $171,1 \pm 2,4$ см, вес $81,3 \pm 3,6$ кг. Клиническое иссле-

дование проводилось с разрешения Локального комитета по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания. Все пациенты были ознакомлены с процедурой тестирования и подписывали протокол информированного согласия.

Дизайн исследования включал первичное клинико-инструментальное обследование с базовой оценкой функции внешнего дыхания методом спирометрии форсированного выдоха с анализом кривой поток-объем, исследование реактивности дыхательных путей путем выполнения стандартной эукапнической гипервентиляции холодным воздухом (-20°C), сбор индуцированной мокроты (ИМ) при первичном визите (первый визит), последующий 48-недельный период лечения и завершающий период наблюдения с повторным инструментальным тестированием и забором биоматериала для цитологического и цитохимического исследования (второй визит). Оценку контроля астмы проводили при помощи валидизированного вопросника Asthma Control Test (ACT, Quality Metric Inc., 2002), в качестве критериев полного, хорошего и недостаточного контроля служили результаты, составляющие 25, 24-20 и менее 20 баллов, соответственно.

На момент включения в исследование пациенты получали терапию комбинированным препаратом – будесонид/формотерол в дозе 160/4,5 мкг/сут., сальбутамол – в режиме «по требованию» в течение предшествующих 4 недель. В соответствии с протоколом исследования назначался режим ступенчатого увеличения объема комбинированной терапии длительного дозирования с применением будесонида/формотерола в дозе 640/18 мкг/сут. вплоть до достижения полного или, по крайней мере, хорошего контроля, с сохранением контроля в последующем за счёт стабильной поддерживающей дозы будесонида/формотерола – 320/9 мкг/сут. Клиническим критерием эффективности контроля над астмой и, следовательно, над процессом воспаления дыхательных путей служило достижение 20-24 баллов по вопроснику ACT к окончанию исследования.

Для оценки функции внешнего дыхания с проверкой на обратимость обструкции дыхательных путей спустя 15 минут после ингаляции 200 мкг сальбутамола использовали спирограф Easy on-PC (nddMedizintechnik AG, Швейцария). Для верификации ХГДП выполнялась проба изокапнической гипервентиляции холодным воздухом (ИГХВ). Пробу проводили путём гипервентиляции в течение 3 минут охлаждённой до -20°C воздушной смесью, содержащей 5% CO_2 во избежание развития гипокании. Уровень вентиляции соответствовал 60% должной максимальной вентиляции лёгких. Контрольные исследования вентиляционной функции лёгких выполнялись перед началом холодовой провокации и после неё на 1-й и 5-й минутах восстановительного периода [12].

Сбор ИМ осуществлялся по стандартной методике под спирометрическим контролем. Исследование ИМ проводилось не позднее 2 часов после её получения

[11, 16]. Изучение микропрепаратов ИМ выполняли по общепринятой методике при помощи светооптической иммерсионной микроскопии с подсчетом не менее 400 клеток в 100 полях зрения в центральных и периферических частях мазка. Предварительно отбирался материал с минимальным уровнем контаминации плоскоклеточным эпителием (менее 20% плоских эпителиоцитов от всех клеток). Подсчитанное количество нейтрофильных лейкоцитов, эозинофильных лейкоцитов, макрофагов, лимфоцитов и клеток бронхиального эпителия выражали в процентах [11, 15].

Цитохимическое исследование активности МПО нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов в цитологических мазках ИМ проводилось с помощью метода Грэхема-Кнолля [15] с докраской мазков после обработки бензидином и перекисью водорода водным раствором азура-2. Изображения микропрепаратов регистрировали с помощью цифровой видеокамеры ДСМ 510 (Hangzhou Scopetek Opto-Electric Co., Ltd., КНР) с системой 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).

Степень и интенсивность процессов деструкции в нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитах определяли по методу Л.А.Матвеевой [5].

Условия проведения функциональных исследований были соблюдены в соответствии с Международными согласительными документами. Во избежание влияния циркадных ритмов на результаты исследования все пациенты обследовались в первую половину дня.

Статистический анализ полученного материала проводился на основе стандартных методов вариационной статистики. Для определения достоверности различий использовали парный критерий t (Стьюдента). Для всех величин принимались во внимание уровни значимости (p).

Результаты исследования и их обсуждение

Как следует из таблицы 1, на старте исследования, согласно критериям ACT, за последние 4 недели практически все больные имели низкий контроль над заболеванием, составивший в среднем 14,0 (12,0; 15,5) баллов. При выполнении базовой спирометрии отмечался существенный прирост ОФВ_1 спустя 15 минут после ингаляции 200 мкг сальбутамола, что свидетельствовало о высокой обратимости обструкции дыхательных путей. Все пациенты имели клинически значимые симптомы реагирования на холодный воздух в повседневной жизни с эпизодами затруднённого дыхания, удушья, что заставляло дополнительно использовать короткодействующий бронхолитик при прямом контакте с холодом. Чрезмерная лабильность бронхов наблюдалась и в процессе тестирования больных в условиях лаборатории при пробе ИГХВ. В среднем по

группе в соответствии со степенной классификацией тяжести синдрома ХГДП [12] регистрировалось его среднетяжелое течение, изменение $\Delta\text{ОФВ}_1$ в ответ на бронхопровокацию составило $-20,4\pm 3,2\%$.

Всем пациентам подбирался режим использования комбинированного препарата с длительностью лечения в стабильной дозе, описанный выше. По окончании

срока наблюдения наблюдалось значимое улучшение контроля астмы по вопроснику АСТ – 20,5 (15,5; 23,5) баллов, базовых показателей функции внешнего дыхания с тенденцией к уменьшению обратимого компонента обструкции в ответ на бронхолитик. Хорошего контроля над заболеванием (АСТ 20-24 баллов) удалось достичь только у 58% больных.

Таблица 1

Клинико-функциональная характеристика больных за период наблюдения (M±m)

Показатели	Первый визит	Второй визит	p
АСТ, баллы	14,4±1,2	19,4±1,3	0,0255
ОФВ ₁ , % долж.	87,4±3,3	94,8±3,5	0,0785
ПОС, % долж.	88,7±3,0	99,2±3,7	0,0011
МОС ₅₀ , % долж.	55,0±3,1	64,5±4,2	0,0495
$\Delta\text{ОФВ}_{1Б}$, %	17,7±5,7	9,0±3,2	0,0986

Примечание: здесь и далее p – уровень значимости различий показателя по сравнению с первым визитом; $\Delta\text{ОФВ}_{1Б}$ – изменение показателя при проведении пробы с бронхолитиком.

Анализ базовых цитогрaмм ИМ больных в динамике позволяет констатировать, что под воздействием проведённой терапии в структуре воспалительно-клеточного спектра бронхов происходило значимое снижение числа эозинофилов, а также эпителиоцитов, скорее всего, сопряжённое с падением уровня эозинофилов (рис.). Наряду с этим, количество нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов на момент окончания исследования статистически достоверно не изменялось, показатель нейтрофильного компонента оставался достаточно высоким с тенденцией к дальнейшему росту.

При рассмотрении инерции сдвигов числа нейтрофилов в ответ на предложенное лечение следует при-

нимать во внимание, что у астматиков нейтрофильный тип воспаления бронхов коррелирует с системным воспалением, а клинические результаты лечения у таких больных хуже, чем у пациентов с ненейтрофильным фенотипом астмы [30]. Мы предполагаем наличие связи между риском возникновения неконтролируемого течения астмы и устойчивой инициацией воспаления, которая создаётся стабильно высокой концентрацией бронхиальных нейтрофилов, не реагирующей на применённый нами режим противовоспалительной терапии. В этом случае количественный показатель нейтрофилов можно трактовать как прогностически значимый для возможной утраты достигнутого в процессе лечения контроля над заболеванием.

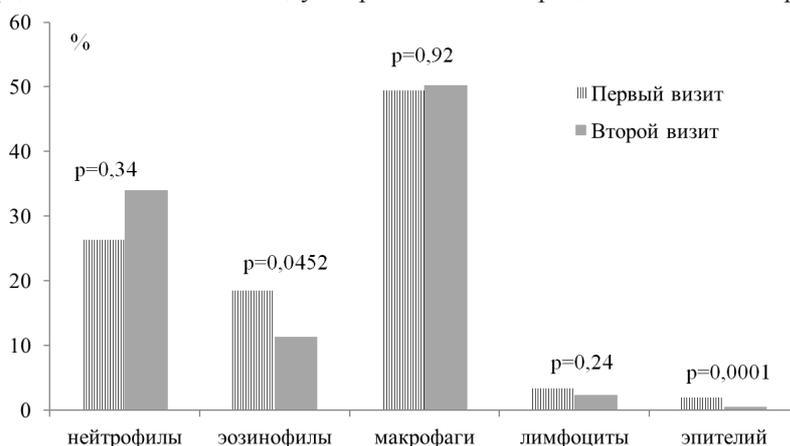


Рис. Клеточный состав индуцированной мокроты в динамике (в %).

По данным литературы, базовый вклад нейтрофилов в воспаление – респираторный взрыв – праймируется широким набором провоспалительных цитокинов [6, 28], включающим провоспалительный цитокин IL-8 – фактор аттракции нейтрофилов из группы хемоаттрактивных пептидов – α -хемокинов [27], ассоциируемый с патогенетическими элементами астмы [27, 30]. Зарубежными авторами были вскрыты механизмы взаимодействия IL-8 с клетками-мише-

нями через связывание с α -IL8-рецептором (IL8RA) и значимой ролью гена IL8RA в предрасположенности к развитию астмы [27]. Отмечено повышение экспрессии IL8RA и гена IL8RB, кодирующего другой высокоаффинный рецептор IL-8 при астме нейтрофильного воспалительного фенотипа [30]. В проведённых нами ранее исследованиях показано, что уровень IL-8 в конденсате выдыхаемого воздуха у больных БА с ХГДП в 1,5-2 раза превышает соответствующие уровни у аст-

матиков с другими видами гиперреактивности бронхов [13].

Респираторный взрыв нейтрофилов запускается активацией клеточных рецепторов, активацией киназ и гуанозинтрифосфатаз, ведущих к фосфорилированию и мембранной передислокации оксидазных компонентов, сборке NADPH-оксидазы [6, 28]. Праймирующими агентами по сборке единого нейтрофильного NADPH-оксидазного комплекса являются цитокины [6, 28], в бронхах больных БА с ХГДП – IL-8 [13]. В ходе респираторного взрыва NADPH-оксидаза восстанавливает кислород до супероксид-аниона, который далее под действием супероксиддисмутазы спонтанно превращается в H₂O₂. На этом этапе в респираторный взрыв встраивается высвобождаемая из азурофильных гранул МПО, конвертирующая оксидативный стресс в галогенирующий. Главным продуктом системы МПО–H₂O₂ выступает хлорноватистая кислота (HOCl) – самый яркий предшественник свободных радикалов из представителей семейства АФГ [3, 8, 9].

По отношению к механизму образования гипохлоритов можно допустить, что на момент окончания лечения потребность в генерации АФГ в бронхах больных снижается, на что указывает статистически значимое уменьшение интенсивности цитолиза эозинофилов и нейтрофилов (табл. 2), зависящее от активации лизосомных ферментов и связанное с экзоцитозом МПО при дегрануляции. Одновременно с этим в динамике нами была обнаружена сильная тенденция к повышению СЦК МПО в гранулоцитах (65,9±5,4 и 98,2±14,1 пикселей, соответственно, p=0,0637), отражающая

внутриклеточное накопление энзима.

В одной из наших работ пероксидазе отводится роль биомаркера хронического воспаления бронхов у больных БА с ХГДП: концентрация внутриклеточной МПО повышается по мере достижения контроля над заболеванием, свидетельствуя об ослаблении воспалительного ответа в части пероксидазного катализа синтеза АФГ [10]. Чем больше содержание МПО в цитоплазме лейкоцитов, тем слабее экстрацеллюлярная активность фермента, манифестирующая замедление воспалительного процесса со стороны активности поступающих в бронхиальный интерстиций галоидных кислот, оксидантная функция которых в некоторой степени деактивируется уменьшением выброса МПО из клеток, что сопровождается накоплением фермента в гранулах. Многочисленность нейтрофильной популяции в ИМ у астматиков с ХГДП, толерантная к лечению на протяжении всего периода наблюдения, скорее всего, направлена на длительное поддержание нейтрофилами собственного праймирующего ресурса респираторного взрыва. Известно, что нейтрофилы обладают способностью к продукции «самостимулирующих» цитокинов, потенцирующих максимальное раскрытие эффекторных возможностей клеток [6]. В нейтрофилах бронхиального секрета наших пациентов, вероятнее всего, происходят процессы резервирования МПО, протеинов и других медиаторов воспаления с целью активации клеточного возбуждения, подготовки к наиболее выраженной воспалительной реакции при холодном воздействии.

Таблица 2

Цитоморфологические показатели деструкции и интенсивности цитолиза эозинофильных и нейтрофильных лейкоцитов ИМ (M±m)

Этапы наблюдения	Индекс деструкции эозинофилов	Интенсивность цитолиза эозинофилов	Индекс деструкции нейтрофилов	Интенсивность цитолиза нейтрофилов
Первый визит	-	0,60±0,10	-	0,61±0,05
Второй визит	0,41±0,02	0,37±0,04; p=0,0459	0,44±0,02	0,42±0,04; p=0,0457

Помимо МПО, дополнительными критериями эффективности различных вариантов базисной противовоспалительной терапии у больных БА с ХГДП являются цитоморфологические признаки деструкции эозинофилов и нейтрофилов [10]. Деструктивные изменения гранулоцитов по окончании срока наблюдения были обнаружены в обеих популяциях. При этом вероятность исхода деструкции в некроз, следующий за нарушением структурной целостности цитолеммы и разрушением цитоплазмы, была выше у нейтрофилов, вследствие толерантности к проводимому лечению.

Активация деструкции лейкоцитов, неблагоприятная для достижения и поддержания контролируемого течения БА [10], сопряжена с нарушением апоптоза. При астме к супрессии апоптоза гранулоцитов причастно IL-5–зависимое увеличение экспрессии генов bcl-2, что оказывает негативное влияние на апоптоз, пролонгирует повреждающую активность гранулоцитов и увеличивает долю некротически гибнущих клеток [1, 2]. Ранее нами было установлено, что у больных

БА с ХГДП происходит значительное повышение уровня регулирующего апоптоз и способствующего деструкции и некрозу клеток IL-5 [13]. Интенсивные процессы цитолиза и деструкции, как результат напряжения функциональной активности клетки, ассоциированы с воспалительной альтерацией, приводящей к лизису клеточной мембраны, изоляции и некрозу клетки с выбросом флогенных агентов в окружающую среду и последующим прогрессированием воспаления [7].

Вариантом судьбы нейтрофилов, альтернативным апоптозу и некрозу, служит нетоз (NETosis, кислород-зависимая клеточная гибель), или процесс образования «нейтрофильных внеклеточных ловушек» (Neutrophil Extracellular Traps, NETs, НВЛ), стимулируемый АФК, – контролируемое высвобождение внутриклеточных компонентов: сетеподобных структур, состоящих из деконденсированного хроматина (нити ДНК, гистоны), белков и ферментов гранул, в том числе МПО [3, 20, 29]. Синтез НВЛ начинается с праймирования нейтро-

фила, запуска NADPH-оксидазного ферментного комплекса и дыхательного взрыва, образования АФК, индуцирующих нейтрофильную эластазу и PAD-4, превращающих аргинин и остатки метиларгинина в цитруллин в гистоновых белках ядра, вследствие чего деконденсируется хроматин, теряется сегментация ядра, ядерная оболочка распадается на множество мелких пузырьков; затем происходит растворение цитоплазматических гранул с распределением их содержимого по всему объему клетки, активируется цитоскелет; хроматин и разрушенные мембраны исчезающих органелл цитоплазмы смешиваются, дезинтегрируются, и разрывается цитолемма [3, 18, 26, 29]. Нейтрофил погибает, а высокоактивная смесь, попав во внеклеточное пространство, формирует объемную сеть – «ловушку», важный инструмент фагоцитоза, элиминации патогенов и воспаления [3, 18].

Структурные изменения ядра и распад кариолеммы на множество пузырьков нейтрофила, предшествующие образованию сетей, отличают нетоз от некроза клеток. В повседневной клинической практике исследование мазков ИМ ограничивается методом светоптической микроскопии, поэтому цитологические находки деструкции нейтрофилов нельзя интерпретировать в пользу нетоза. Дифференцировать некроз и нетоз можно с помощью ультраструктурного анализа препаратов (сканирующая электронная микроскопия) и визуализации ДНК высокочувствительными флюоресцентными красителями [3]. Ввиду того, что обе эти формы клеточной гибели служат биологической цели развития и поддержания воспаления, не исключена вероятность существования нетоза и НВЛ в инфильтрате бронхов больных БА с положительной реакцией на пробу ИГХВ. Нетоз и некроз нейтрофилов, способствуя эскалации воспаления и оксидативного стресса в дыхательных путях таких пациентов, затрудняют адекватную реакцию больных на лечение и несут в себе риск возможного снижения достигнутого эффективного контроля над астмой.

Больные БА с ХГДП при применении комбинированной терапии будесонидом/формотеролом при использованном нами режиме ступенчатого увеличения и длительного дозирования остаются уязвимыми в плане риска утраты контролируемого течения болезни. Устойчиво высокий уровень нейтрофилов в ИМ у этих больных может сыграть негативную роль в низком отклике на проводимое лечение.

Таким образом, использование режима противовоспалительной терапии длительностью 48 недель с применением комбинированного препарата будесонид/формотерол, ориентированное на достижение клинических критериев контроля над астмой у больных с ХГДП, не позволяет достигнуть коррекции нейтрофильного звена воспаления. Количественный показатель нейтрофилов в ИМ у таких больных имеет прогностическое значение для возможной утраты достигнутого контроля над болезнью. Полученные данные требуют поиска путей оптимизации медикаментозной коррекции БА у лиц с синдромом ХГДП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванчук И.И., Сазонов А.Э., Петровский Ф.И., Лещева И.С., Копьева А.П., Петрова И.В. Роль интерлейкина-5 в механизмах апоптотической гибели эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой // Бюллетень Сибирской медицины. 2003. №2. С.38–43.
2. Иванчук И.И., Огородова Л.М., Сазонов Э.А., Лещева И.С., Копьева А.П., Петрова И.В., Малышев И.Ю. Влияние рекомбинантного интерлейкина-5 на апоптотическую гибель эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. 2004. Т.6, №1-2. С.117–120.
3. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012. №4. С.23–32.
4. Мальцева Т.А., Пирогов А.Б. Маркёры воспаления дыхательных путей у больных бронхиальной астмой с холодовой бронхиальной гиперреактивностью // Вопросы сохранения и развития здоровья населения Севера и Сибири: мат. науч.-практ. конф. Красноярск, 2013. С.50–51.
5. Матвеева Л.А. Местная защита респираторного тракта у детей. Томск: изд-во Том. ун-та, 1993. 276 с.
6. Маянский А.Н. НАДФ-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция // Цитокины и воспаление. 2007. Т.6, №3. С.3–13.
7. Невзорова В.А., Пазыч С.А., Бархатова Д.А., Кудрявцева В.А. Роль процессов клеточной гибели в развитии воспаления при бронхиальной астме // Тихоокеанский медицинский журнал. 2006. №2. Р.54–58.
8. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Галогенирующий стресс и его биомаркеры // Вестник Российской АМН. 2010. №1. С.27–39.
9. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // Успехи биологической химии. 2013. Т.53. С.195–244.
10. 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.
11. Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Зиновьев С.В., Афанасьева Е.Ю., Колосов В.П. Воспалительный паттерн слизистой оболочки бронхов у больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. Т.161, №4. С.542–546.
12. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П. Гиперреактивность дыхательных путей. Владивосток: Дальнаука, 2011. 204 с.
13. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Пирогов А.Б., Бородин Е.А., Ушакова Е.В., Ульянычев Н.В., Колосов А.В. Фенотипические различия и особенности воспа-

ления у больных бронхиальной астмой с изолированной и сочетанной реакцией дыхательных путей на холодный воздух и дистиллированную воду // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2014. Вып.54. С.8–16.

14. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П., Ульянычев Н.В., Нарышкина С.В., Афанасьева Е.Ю. Особенности течения бронхиальной астмы у больных с изолированной и сочетанной реактивностью дыхательных путей на холодовой и гипосолеарный стимулы // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2014. Вып.53. С.36–41.

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

16. 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.

17. Bedenice D., Mazan M.R., Hoffman A.M. Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease // *J. Vet. Intern. Med.* 2008. Vol.22, №4. P.1022–1028.

18. Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. Vol.5, №8. P.577–582.

19. Davis M.S., Williams C.C., Meinkoth J.H., Malayer J.R., Royer C.M., Williamson K.K., McKenzie E.C. Influx of neutrophils and persistence of cytokine expression in airways of horses after performing exercise while breathing cold air // *Am. J. Vet. Res.* 2007. Vol.68, №2. P.185–189.

20. Dewas C., Dang P.M., Gougerot-Pocidallo M.A., El-Benna J. TNF- α induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *J. Immunol.* 2003. Vol.171, №8, P.4392–4398.

21. Elbim C., Guichard C., Dang P.M., Fay M., Pedruzzi E., Demur H., Pouzet C., El Benna J., Gougerot-Pocidallo M.A. Interleukin-18 primes the oxidative burst of neutrophils in response to formyl-peptides: role of cytochrome b558 translocation and N-formyl peptide receptor endocytosis // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005. Vol.12, №3. P.436–446.

22. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Updated 2016). URL: <http://www.ginasthma.com>.

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

24. Kolosov V.P., Pirogov A.B., Perelman J.M., Naryshkina S.V., Maltseva T.A. Achievement of asthma control in patients with cold airway hyperresponsiveness at different variants of basic therapy // *Eur. Respir. J.* 2013. Vol.42. Suppl.57. P.400.

25. Maltseva T.A., Pirogov A.B., Kolosov V.P., Naryshkina S.V., Ushakova E.V. Cell composition of induced sputum in patients with uncontrolled asthma and its participation in the formation of cold hyperresponsiveness // *Eur. Respir. J.* 2013. Vol.42, Suppl.57. P.401.

26. Neeli I., Khan S.N., Radic M. Histone deimination

as a response to inflammatory stimuli in neutrophils // *J. Immunol.* 2008. Vol.180, №3. P.1895–1902.

27. 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. P.2.

28. Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E., McLaughlin N.J., Banerjee A., Silliman C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation // *J. Leukoc. Biol.* 2005. Vol.78. P.e1025–1042.

29. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis and cell death // *Sci. STKE.* 2007. Vol.379. P.11.

30. 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.

REFERENCES

1. Ivanchuk I.I., Sazonov A.E., Petrovskiy F.I., Leshcheva I.S., Kop'eva A.P., Petrova I.V. The role of IL-5 in the mechanisms of apoptosis of peripheral blood eosinophils of patients with bronchial asthma. *Byulleten' Sibirskoy meditsiny* 2003; 2:38–43 (in Russian).

2. Ivanchuk L.I., Ogorodova L.M., Sazonov A.E., Leshcheva I.S., Koljeva A.P., Petrova I.V., Malyshev I.Yu. The influence of recombinant interleukin-5 on eosinophil apoptosis in patients with bronchial asthma. *Meditinskaya immunologiya* 2004; 6 (1-2):117–120 (in Russian).

3. Korotina O.L., Generalov I.I. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation, functions. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya* 2012; 4:23–32 (in Russian).

4. Mal'tseva T.A., Pirogov A.B. Markers of inflammation of the respiratory tract in patients with bronchial asthma with cold bronchial hyperresponsiveness. In: Scientific-practical conference "The questions of the maintenance and development of the health of the population of the North and Siberia". Krasnoyarsk; 2013:50–51 (in Russian).

5. Matveeva L.A. Local protection of the respiratory tract in children. Tomsk; 1993 (in Russian).

6. Mayansky A.N. NADPH-oxidase of neutrophils: activation and regulation. *Tsitokiny i vospalenie* 2007; 6(3):3–13 (in Russian).

7. Nevzorova V.A., Pazych S.A., Barkhatova D.A., Kudryavtseva V.A. The role of process cell death in course of inflammation under bronchial asthma. *Pacific Medical Journal* 2006; (2):54–58 (in Russian).

8. Panasenko O.M., Sergienko V.I. Halogenizing stress and its biomarkers. *Annals of the Russian Academy of Medical Science* 2010; (1):27–39 (in Russian).

9. Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Uspekhi biologicheskoy khimii* 2013; 53:195–244 (in Russian).

10. 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* 2014; (53):50–56 (in Russian).

11. Pirogov A.B., Prikhodko A.G., Perelman J.M., Zinov'ev S.V., Afanas'eva E.Yu., Kolosov V.P. Inflammatory pattern of bronchial mucosa in patients with bronchial asthma and airway hyperresponsiveness to hyposmotic stimulus. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* 2016; 161(4):542–546 (in Russian).

12. Prikhodko A.G., Perelman J.M., Kolosov V.P. Airway hyperresponsiveness. Vladivostok: Dal'nauka; 2011 (in Russian).

13. Prikhodko A.G., Perelman J.M., Pirogov A.B., Borodin E.A., Ushakova E.V., Ul'yanychev N.V., Kolosov A.V. Phenotypic differences and peculiarities of inflammation in asthmatics with isolated and combined airway hyperresponsiveness to cold air and distilled water. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2014; (54):8–16 (in Russian).

14. Prikhodko A.G., Perelman J.M., Kolosov V.P., Ul'yanychev N.V., Naryshkina S.V., Afanas'eva E.Yu. Features of bronchial asthma clinical course in patients with isolated and combined airway hyperresponsiveness to cold and hyposmotic stimuli. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2014; (53):36–41 (in Russian).

15. Hayhoe F.G.H., Quaglino D. Hematological cytochemistry. Moscow: Meditsina; 1983 (in Russian).

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

17. Bedenice D., Mazan M.R., Hoffman A.M. Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease. *J. Vet. Intern. Med.* 2008; 22(4):1022–1028.

18. Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5(8): 577–582.

19. Davis M.S., Williams C.C., Meinkoth J.H., Malayer J.R., Royer C.M., Williamson K.K., McKenzie E.C. Influx of neutrophils and persistence of cytokine expression in airways of horses after performing exercise while breathing cold air. *Am. J. Vet. Res.* 2007; 68(2):185–189.

20. Dewas C., Dang P.M., Gougerot-Pocidalò M.A., El-Benna J. TNF- α induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is

a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* 2003; 171(8):4392–4398.

21. Elbim C., Guichard C., Dang P.M., Fay M., Pedruzzi E., Demur H., Pouzet C., El Benna J., Gougerot-Pocidalò M.A. Interleukin-18 primes the oxidative burst of neutrophils in response to formyl-peptides: role of cytochrome b558 translocation and N-formyl peptide receptor endocytosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12(3):436–446.

22. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Updated 2016). Available at: www.ginasthma.com.

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

24. Kolosov V.P., Pirogov A.B., Perelman J.M., Naryshkina S.V., Maltseva T.A. Achievement of asthma control in patients with cold airway hyperresponsiveness at different variants of basic therapy. *Eur. Respir. J.* 2013; 42(57):400s.

25. Maltseva T.A., Pirogov A.B., Kolosov V.P., Naryshkina S.V., Ushakova E.V. Cell composition of induced sputum in patients with uncontrolled asthma and its participation in the formation of cold hyperresponsiveness. *Eur. Respir. J.* 2013; 42(57):401s.

26. Neeli I., Khan S.N., Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J. Immunol.* 2008; 180(3):1895–1902.

27. 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; 4:2s.

28. Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E., McLaughlin N.J., Banerjee A., Silliman C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78:1025–1042.

29. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis and cell death. *Sci. STKE* 2007; 379:pe11.

30. 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.

Поступила 06.05.2016

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