

## Гранулоциты бронхов в развитии деструкции эпителия и окислительной модификации липидов у больных бронхиальной астмой с холодовой и осмотической гиперреактивностью дыхательных путей

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

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

### Резюме

Свободнорадикальное повреждение респираторного тракта у больных бронхиальной астмой (БА) приводит к деструкции паренхимы бронхов и генерации паренхиматозными клетками сигнальных молекул воспаления. Цель исследования – изучить роль структурно-функционального статуса гранулоцитов в развитии деструкции эпителия и окислительной модификации липидов в бронхах больных БА с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой и гиперосмолярный стимулы. **Материал и методы.** У 48 больных БА оценили уровень контроля астмы по вопроснику Asthma Control Test (ACT), функцию легких, реакцию бронхов на пробы с 3-минутной изокапнической гипервентиляцией холодным ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) воздухом (ИГХВ) и с ультразвуковой ингаляцией гипертонического (4,5 %) раствора NaCl (ИГР); в индуцированной мокроте изучили клеточный состав, степень клеточной деструкции, в гранулоцитах выявили продукты реакции на ферменты из группы гем-содержащих пероксидаз (миелопероксидазу в нейтрофилах, пероксидазу в эозинофилах) с расчетом среднего цитохимического коэффициента; в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) – содержание продуктов перекисного окисления липидов по ультрафиолетовым спектрам поглощения липидных экстрактов. **Результаты.** Больные 1-й группы ( $n=15$ ) с бронхиальной гиперреактивностью на пробы ИГХВ и ИГР по отношению ко 2-й группе ( $n=33$ ) с отрицательной реакцией на пробы имели более низкий ACT (соответственно  $14,7\pm 1,4$  и  $18,4\pm 0,8$  балла,  $p=0,017$ ). В мокроте число нейтрофилов в 1-й и 2-й группах составило соответственно  $41,8\pm 6,4$  и  $33,6\pm 3,4$  %, эозинофилов –  $23,5\pm 3,5$  и  $14,9\pm 2,6$  %; средний цитохимический коэффициент пероксидазы равнялся  $117,5\pm 12,5$  и  $88,8\pm 8,9$  пикселей ( $p=0,07$ ), индекс деструкции клеток (ИДК) бронхиального эпителия  $0,56\pm 0,04$  и  $0,39\pm 0,02$  усл. ед. ( $p=0,0002$ ). В КВВ содержание диеновых конъюгатов (E233) в 1-й группе было выше, чем во 2-й ( $0,07\pm 0,01$  и  $0,05\pm 0,01$  ед. опт. пл.,  $p<0,05$ ). Найдена корреляционная связь между уровнем пероксидазы и ИДК, количеством totally разрушенных клеток (IV класс клеточной деструкции), между числом нейтрофилов в индуцированной мокроте и E233, отношением E233 к E206 (неокисленные липиды) в КВВ. **Заключение.** У больных БА с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой и гиперосмолярный стимулы изменения в структуре эпителия и структурно-функциональном профиле гранулоцитов сопряжены с активацией пероксидазной функции гранулоцитов и взаимосвязаны с перекисным окислением липидов.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, гиперреактивность дыхательных путей, гранулоциты бронхов, гем-содержащие пероксидазы, деструкция бронхиального эпителия, перекисное окисление липидов.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарность:** Авторы выражают благодарность к.м.н. Пироговой Наталье Алексеевне за помощь в анализе цитологического материала.

**Финансирование:** Исследование проводилось без участия спонсоров.

**Автор для переписки:** Перельман Ю.М., e-mail: jperelman@mail.ru

**Для цитирования:** Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Перельман Ю.М. Гранулоциты бронхов в развитии деструкции эпителия и окислительной модификации липидов у больных бронхиальной астмой с холодовой и осмотической гиперреактивностью дыхательных путей. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (2): 40–48. doi: 10.18699/SSMJ20210206

## Bronchial granulocytes in the development of epithelial destruction and oxidative lipid modification in patients with bronchial asthma with cold and osmotic airway hyperresponsiveness

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

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration  
675000, Blagoveshchensk, Kalinin str., 22

### Abstract

Free radical damage to the respiratory tract in patients with asthma leads to the destruction of the bronchial parenchyma and the generation of signaling molecules of inflammation by parenchymal cells. Objective: to study the role of the structural and functional status of granulocytes in the development of epithelial destruction and oxidative lipid modification in the bronchi of asthma patients with airway hyperresponsiveness to cold and hyperosmolar stimuli. **Material and methods.** In 48 asthma patients, the level of asthma control was assessed according to the Asthma Control Test (ACT) questionnaire; lung function; bronchial response to 3-minute isocapnic hyperventilation with cold ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) air (IHCA) and with ultrasonic inhalation of hypertonic (4.5 %) NaCl solution (IHS). The cellular composition and the degree of cellular destruction in induced sputum (IS) were measured. Reaction products for enzymes from the group of heme-containing peroxidases (myeloperoxidase in neutrophils, peroxidase in eosinophils) with the calculation of the average cytochemical coefficient were studied. The content of lipid peroxidation products in according to ultraviolet absorption spectra of lipid extracts in exhaled breath condensate (EBC) was assessed. **Results.** Patients of group 1 ( $n=15$ ) with airway hyperresponsiveness to IHCA and IHS in relation to group 2 ( $n=33$ ) with a negative reaction had lower ACT ( $14.7\pm 1.4$  vs.  $18.4\pm 0.8$  points,  $p=0.017$ ). In sputum, the number of neutrophils in groups 1 and 2 was  $41.8\pm 6.4$  vs.  $33.6\pm 3.4$  %, eosinophils –  $23.5\pm 3.5$  vs.  $14.9\pm 2.6$  %; average cytochemical coefficient of peroxidase  $117.5\pm 12.5$  vs.  $88.8\pm 8.9$  pixels ( $p=0.07$ ), cell destruction index (CDI) of bronchial epithelium  $0.56\pm 0.04$  vs.  $0.39\pm 0.02$  r.u. ( $p=0.0002$ ). The content of diene conjugates (E233) in EBC in group 1 was higher than in group 2 ( $0.07\pm 0.008$  vs.  $0.05\pm 0.005$  optical units,  $p<0.05$ ). A correlation was found between peroxidase level and CDI, the number of totally destroyed cells (IV class of cell destruction), between the number of neutrophils in IS and E233, as well as the ratio of E233 to E206 (non-oxidized lipids) in EBC. **Conclusion.** In asthma patients with airway hyperresponsiveness to cold and hyperosmolar stimuli, changes in the structure of the epithelium and the structural and functional profile of granulocytes are associated with the activation of the peroxidase function of granulocytes and are interrelated with lipid peroxidation.

**Key words:** bronchial asthma, airway hyperresponsiveness, bronchial granulocytes, heme peroxidases, destruction of bronchial epithelium, lipid peroxidation.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments:** The authors wish to thank N.A. Pirogova for her expert assistance in cytological research.

**Funding:** This study was not sponsored.

**Correspondence author:** Perelman Ju.M., e-mail: jperelman@mail.ru

**Citation:** Pirogov A.B., Prikhodko A.G., Perelman Ju.M. Bronchial granulocytes in the development of epithelial destruction and oxidative lipid modification in patients with bronchial asthma with cold and osmotic airway hyperresponsiveness. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (2): 40–48. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210206

### Введение

Свободнорадикальное повреждение респираторного тракта является типичным следствием окислительного стресса, характерного для заболеваний легких [1]. У пациентов с бронхиальной астмой (БА) оно приводит к деструкции паренхимы бронхов [2] и генерации паренхиматозными клетками сигнальных молекул воспаления,

модифицирующих активность ядерного фактора  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) [3, 4] – одного из главных транскрипционных факторов, ассоциированных с активностью воспаления при астме [5, 6]. Хроническое воспаление и гиперреактивность дыхательных путей при БА могут быть спровоцированы влиянием различных триггеров – индукторов генерации активных форм кислорода (АФК) и других медиаторов клеточного окисления, регулирую-

щих экспрессию NF-κB и провоспалительных цитокинов [5, 6]. Представляет интерес соотношение респираторного взрыва гранулоцитов и воспаления при тех видах гиперреактивности, молекулярно-генетический механизм развития которых установлен. В частности, в основе сочетания реакции бронхов на холодовой и осмотический стимулы лежит активация экспрессированных на эпителиальных и соединительнотканых клетках термо- и осмочувствительных TRP-рецепторов, стимулирующих секрецию провоспалительных цитокинов и активацию клеточных эффекторов воспаления [7].

Наряду с бронхиальной гиперреактивностью, ключевой характеристикой БА является ремоделирование бронхов, базирующееся на преобразовании слизистой оболочки: разрушении эпителия, утолщении ретикулярной базальной мембраны, ангиогенезе и эозинофильной инфильтрации собственной пластинки, что обнаруживается уже на самых ранних этапах течения болезни и прогрессирует по мере нарастания ее тяжести [2]. Ремоделирование бронхов при тяжелой астме сопровождается преобладанием содержания в воспалительном инфильтрате сегментоядерных нейтрофилов и приводит к атрофии эпителиальной выстилки [8]. Усиление апоптоза сочетается с низким уровнем экспрессии факторов антиоксидантной защиты, а именно супероксиддисмутазы, и с уязвимостью эпителия в отношении агрессивного действия прооксидантов [2].

Развитию экссудации и прогрессированию воспаления дыхательных путей при астме способствует запуск перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1], инициируемый не только метаболитами кислорода, но и высокореакционноспособными гипогалоидными кислотами, образующимися при окислении галогенидов. Окисление галогенидов катализируется ферментами группы гем-содержащих пероксидаз млекопитающих, главным образом миелопероксидазой нейтрофилов и пероксидазой эозинофилов [9]. Гранулоцитарная пероксидаза как индуктор активных форм галогенов (АФГ), участвующих в окислительной модификации липидов и стимуляции экспрессии генов провоспалительных цитокинов, может рассматриваться в качестве связующего звена между ремоделированием бронхов и воспалением. Ввиду очевидной зависимости ремоделирования и воспаления от воздействия прооксидантов, актуальна оценка взаимосвязи между пероксидазной активностью гранулоцитов, развитием эпителиальной дисфункции, генерацией продуктов ПОЛ в дыхательных путях пациентов с БА и различными видами бронхиальной гиперреактивности.

Целью работы явилось изучение структурных особенностей и пероксидазной функции гранулоцитов в развитии деструкции эпителия и окислительной модификации липидов в бронхах больных БА с гиперреактивностью дыхательных путей к холодовому и гиперосмолярному стимулам.

## **Материал и методы**

Исследование проводилось с разрешения и под надзором Локального комитета по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания (протокол № 121 от 25.10.17), при соблюдении этических принципов проведения медицинских исследований с участием людей [10]. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов при рассмотрении протокола исследования.

Основными критериями включения больных в исследование были: возраст от 20 до 60 лет; документально подтвержденный клинический диагноз персистирующей БА [11]; объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ<sub>1</sub>) на момент тестирования более 70 % должной величины; добровольное согласие пациента на участие в исследовании, заверенное подписью респондента и исследователя. Критерии исключения: наличие сопутствующей патологии, которая могла повлиять на результаты исследования; наличие острых респираторных заболеваний и обострения БА в течение предшествующих 4 четырех недель.

В одномоментном наблюдательном исследовании приняли участие 48 больных с ранее установленным диагнозом персистирующей БА легкой и средней тяжести, согласно критериям GINA [11].

Дизайн работы включал анкетирование больных с помощью вопросника Asthma Control Test (ACT, Quality Metric Inc., 2002); исследование вентиляционной функции легких (ОФВ<sub>1</sub>) при спирометрии (Easy on PC, ndd Medizintechnik AG, Швейцария); оценку реакции дыхательных путей (ΔОФВ<sub>1</sub>) на бронхопровокационные пробы с 3-минутной изокапнической гипервентиляцией холодным (–20 °C) воздухом (ИГХВ) [12] и 3-минутной ультразвуковой ингаляцией гипертонического (4,5 %) раствора NaCl (ИГР) [13]; сбор и анализ конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ), образцов индуцированной мокроты по методике, описанной ранее [13]. Условия проведения функциональных исследований были соблюдены в соответствии с требованиями международных документов Американского торакального общества и Европейского респираторного общества (2005). Перед тестированием больных просили воздержаться от приема бронхолитических препаратов как минимум за 6–24 часов до предполагаемой процедуры.

Анализ индуцированной мокроты проводили не позднее 2 часов после ее получения. КВВ по окончании сбора немедленно помещали в морозильную камеру при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ , где хранили до биохимических исследований. Микропрепараты изучали при помощи светооптической иммерсионной микроскопии, с подсчетом не менее 400 клеток в 100 полях зрения. Подсчитанное количество клеток выражали в процентах [14]. Продукты реакции на гем-содержащие пероксидазы млекопитающих (миелопероксидазу в нейтрофилах, пероксидазу в эозинофилах) в мазках мокроты выявляли по методу Грэхема – Кнолля [15] с докраской мазков после обработки бензидином и перекисью водорода водным раствором азур II.

Изображения микропрепаратов проходили цифровую обработку, для этих целей использовали компьютерные программы Image Tool и Optika Vision Pro (Италия), Mac Biophotonics Image S (США), далее по оптической плотности маркирующего фермент продукта в клетках рассчитывали средний цитохимический коэффициент пероксидазы (в пикселях). Структурную целостность клеток бронхиального эпителия оценивали путем определения степени деструкции и интенсивности цитолиза [14]. Клетки классифицировали по классам: 0 класс – нормальная структура; I – частичное (не более 1/2) деструктивное повреждение цитоплазмы, нормальная структура ядра; II – значительная (более 1/2), но неполная деструкция цитоплазмы, частичное повреждение ядра; III – полная деструкция цитоплазмы, значительная деструкция ядра; IV – полная деструкция с распадом цитоплазмы и ядра. Подсчитывали суммарный ИДК и индекс интенсивности цитолиза (отношение количества наиболее разрушенных клеток к содержанию остальных поврежденных клеток, ИЦ) используя формулы:

$$\text{ИДК} = (n_I + n_{II} + n_{III} + n_{IV}) / 100;$$

$$\text{ИЦ} = n_{IV} / (n_0 + n_I + n_{II} + n_{III} + n_{IV}),$$

где 0, I, II, III, IV – класс деструкции;  $n_0$ ,  $n_I$ ,  $n_{II}$ ,  $n_{III}$ ,  $n_{IV}$  – количество клеток соответствующего класса.

В КВВ определяли метаболиты ПОЛ по ультрафиолетовым спектрам поглощения липидных экстрактов, регистрацию которых проводили на спектрофотометре Unico 2804 (Unico, США) по двухлучевой схеме в диапазоне длин волн 200–500 нм против этанола. Содержание конъюгированных диенов в образцах КВВ выражали в единицах оптической плотности при 233 нм (E233), конъюгированных триенов (кетодиенов) – в единицах оптической плотности при 278 нм (E278). Максимум пика поглощения неокисленных липи-

дов приходился в анализируемых образцах на 206 нм (E206). Рассчитывали индекс окисленности липидов по первичным и вторичным продуктам ПОЛ – отношение поглощения при 233 нм к поглощению при 206 нм (233/206) и отношение поглощения при 278 нм к поглощению при 206 нм (278/206) соответственно [13].

Статистический анализ полученного материала проводили с использованием программы «Автоматизированная система диспансеризации» [16] на основе стандартных методов вариационной статистики. Оценку соответствия признака закону нормального распределения проводили при помощи критериев Колмогорова – Смирнова, Пирсона – Мизеса. При нормальном типе распределения использовали критерий  $t$  (Стьюдента), при распределении данных, отличном от нормального, применяли критерии Колмогорова – Смирнова и Манна – Уитни. Описательная статистика количественных признаков представлена с помощью среднего арифметического, стандартной ошибки среднего арифметического ( $M \pm m$ ), а также медианы и квартилей ( $Me [Q1; Q3]$ ). Анализ распространенности признака в сравниваемых группах (частота альтернативного распределения) проводили по критерию  $\chi^2$  Пирсона для четырехпольной таблицы. С целью определения степени связи между двумя случайными величинами выполняли корреляционный анализ, рассчитывали коэффициент корреляции ( $r$ ). Для всех величин принимались во внимание уровни значимости ( $p$ ) менее 0,05.

## Результаты

Все больные адекватно перенесли индукцию солевыми растворами, а также острую холодовую бронхопровокацию. По завершении обследования в анализ включены 48 пациентов, средний возраст  $42,0 \pm 1,3$  года, обоего пола (31 мужчина и 17 женщин), ОФВ<sub>1</sub>  $93,2 \pm 2,6$  %,  $\Delta\text{ОФВ}_{1\text{ГХВ}}$   $-4,9 [-12,0; -1,1]$  %,  $\Delta\text{ОФВ}_{1\text{ГР}}$   $-5,7 [-10,0; 2,2]$ . Обращает на себя внимание, что, несмотря на получаемую противовоспалительную терапию (ингаляционные глюкокортикостероиды, бета-2-агонисты длительного действия), АСТ составил 17 [13,0; 21,5] баллов, 67 % больных имели низкий контроль над заболеванием (менее 20 баллов).

В 1-ю группу ( $n=15$ ) были включены лица с гиперреактивностью дыхательных путей на оба провокационных триггера – холодовой и гиперосмолярный ( $\Delta\text{ОФВ}_{1\text{ГХВ}}$   $-18,2 \pm 1,9$  и  $-15,0 \pm 3,2$  % соответственно,  $p > 0,05$ ), во 2-ю группу, сравнения ( $n=33$ ), – с отсутствием холодовой и осмотической гиперреактивности бронхов ( $\Delta\text{ОФВ}_{1\text{ГХВ}}$   $-2,5 \pm 0,77$  и  $-1,8 \pm 1,3$  % соответственно,  $p > 0,05$ ).

Больные 1-й и 2-й групп были сопоставимы по степени тяжести заболевания ( $\chi^2=0,015$ ,  $p>0,05$ ). Больные 1-й группы, по отношению ко 2-й, имели более низкий уровень контроля (АСТ) над заболеванием (соответственно  $14,7\pm1,4$  и  $18,4\pm0,8$  балла,  $p=0,017$ ) и ОФВ<sub>1</sub> ( $88,5\pm5,8$  и  $95,4\pm2,6$  % соответственно,  $p>0,05$ ), более выраженный прирост ОФВ<sub>1</sub> на введение короткодействующего бронхолитика (соответственно  $19,9\pm5,1$  и  $8,2\pm2,1$  %;  $p=0,015$ ). Обращает на себя внимание тот факт, что в обеих группах большая часть больных курили на момент проведения обследования либо имели опыт курения ранее (соответственно 14 и 26 человек,  $p>0,05$ ).

Установлено достоверное снижение количества макрофагов в мокроте больных 1-й группы в сочетании с тенденцией к более высокому по сравнению со 2-й группой содержанию нейтрофилов и эозинофилов (таблица).

Значимых межгрупповых различий в уровне цитоза и содержании клеток бронхиального эпителия в мокроте не выявлено. Рост количества нейтрофилов и эозинофилов у больных 1-й группы сопровождался тенденцией к увеличению

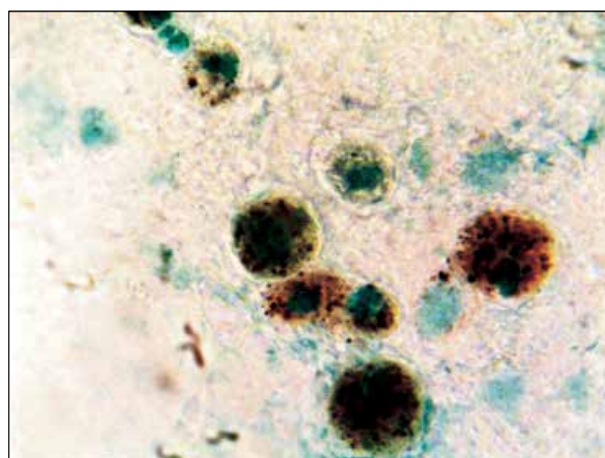
среднего цитохимического коэффициента пероксидазы по сравнению со 2-й группой ( $117,5\pm12,5$  и  $88,8\pm8,9$  пикселя соответственно,  $p=0,07$ ), что свидетельствовало об эскалации синтеза и депонирования фермента в гранулоцитах. Аккумуляция гем-содержащих пероксидаз в лизосомных гранулах эозинофилов и главным образом нейтрофилов связана с возрастающей потребностью в ферменте в условиях окислительного и галогенирующего стресса после воздействия экзогенного триггера.

Реакцией окисления гем-содержащей пероксидазой бензидина в мазках индуцированной мокроты показано, насколько плотно, диффузно или зернисто, может распределяться в гранулоцитах окрашенный в черный цвет продукт реакции на гем-содержащую пероксидазу. В цитоплазме гранулоцитов локализовались как хорошо различимые отдельные гранулы, маркированные бензидином в виде крупных зерен (рис. 1), так и гранулы сливные, не дифференцируемые каждая в отдельности, заполняющие весь объем цитоплазмы и формирующие однородные глыбки бензидина интенсивной черной окраски (рис. 2, 3)

**Таблица.** Характеристика мокроты больных бронхиальной астмой

**Table.** Characteristics of sputum in patients with asthma

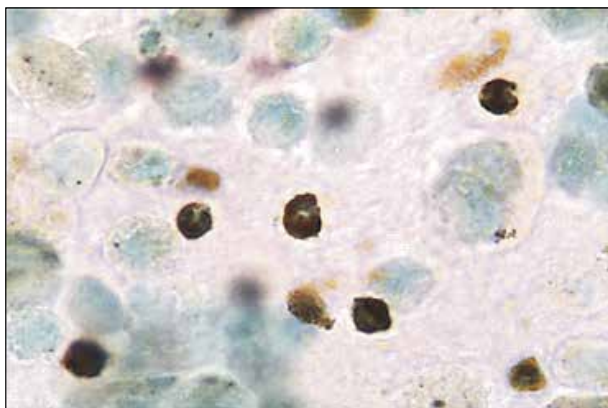
Параметр	1-я группа	2-я группа	<i>p</i>
Цитоз, клеток в 1 мкл	$4,4\pm0,38$	$3,5\pm0,27$	$>0,05$
Количество клеток в мокроте, %			
Нейтрофилы, %	$41,8\pm6,4$	$33,6\pm3,4$	$>0,05$
Эозинофилы, %	$23,5\pm3,5$	$14,9\pm2,6$	$>0,05$
Макрофаги, %	$30,7\pm6,4$	$46,7\pm3,6$	$0,027$
Бронхиальный эпителий, %	$1,68\pm0,80$	$1,71\pm0,81$	$>0,05$
ИДК бронхиального эпителия, усл. ед	$0,56\pm0,04$	$0,39\pm0,02$	$0,0002$
ИЦ бронхиального эпителия, усл. ед	$0,35\pm0,04$	$0,29\pm0,03$	$>0,05$
Класс деструкции бронхиального эпителия, %			
0	$43,6\pm3,8$	$61,0\pm1,9$	$0,002$
I	$13,6\pm2,1$	$7,1\pm1,5$	$0,043$
II	$5,1\pm0,8$	$2,6\pm0,5$	$0,025$
III	$2,4\pm0,4$	$1,34\pm0,4$	$>0,05$
IV	$35,3\pm3,1$	$28,4\pm2,3$	$>0,05$



**Рис. 1.** Продукты реакции на гем-содержащую пероксидазу в лизосомных гранулах гранулоцитов и макрофагов маркируются отложением бензидина в виде зерен. Мазок индуцированной мокроты. Окраска бензидином.  $\times 1250$

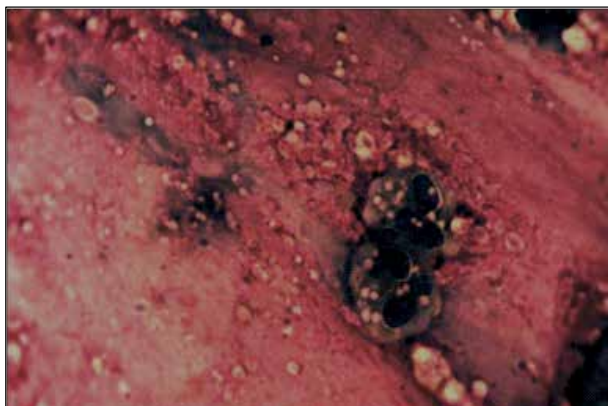
**Fig. 1.** The products of reaction to peroxidase in lysosomal granules of granulocytes and macrophages are marked by the deposition of benzidine in the form of grains. Induced sputum smear. Stained with benzidine.  $\times 1250$





**Рис. 2.** Продукты реакции на гем-содержащую пероксидазу в гранулоцитах выявляются в виде сливных глыбок бензидина, заполняющих цитоплазму. В макрофагах продукты реакции на пероксидазу отсутствуют. Мазок индуцированной мокроты. Окраска бензидином.  $\times 1250$

**Fig. 2.** The products of the reaction to peroxidase in granulocytes are detected in the form of confluent benzidine lumps filling the cytoplasm. In macrophages, the reaction products for peroxidase are absent. There is no reaction to peroxidase in macrophages. Induced sputum smear. Stained with benzidine.  $\times 1250$



**Рис. 3.** Продукты реакции на гем-содержащую пероксидазу в гранулоцитах выявляются в виде сливных и зернистых отложений бензидина. В макрофагах продукты реакции на пероксидазу отсутствуют. Мазок индуцированной мокроты. Окраска бензидином.  $\times 1250$

**Fig. 3.** The products of the reaction to peroxidase in granulocytes are revealed in the form of confluent and granular benzidine deposits. There is no reaction to peroxidase in macrophages. Induced sputum smear. Stained with benzidine.  $\times 1250$

Оценивая деструктивно-цитолитические изменения в эпителии бронхов, мы не нашли значимого различия ИЦ эпителия в 1-й и 2-й группах, между тем как ИДК в 1-й группе превышал величину аналогичного показателя во 2-й группе (см. таблицу). Обнаружена взаимосвязь между уровнем гем-содержащей пероксидазы и показателем деструктивно-цитолитических изменений в бронхиальном эпителии ИДК ( $r=0,64$ ;  $p=0,001$ ), а также IV классом клеточной деструкции ( $r=0,51$ ;  $p=0,01$ ).

Согласно результатам настоящего исследования, концентрация вторичных продуктов ПОЛ в КВВ была больше в 1-й группе. Так, содержание E206 у пациентов 1-й группы составило  $0,29 \pm 0,04$  ед. опт. пл., 2-й группы –  $0,15 \pm 0,01$  ед. опт. пл. ( $p < 0,05$ ), диеновых конъюгатов (E233) –  $0,07 \pm 0,01$  и  $0,05 \pm 0,01$  ед. опт. пл. соответственно ( $p < 0,05$ ). Как следствие, соотношение E233/206, отражающее индекс окисленности липидов для диеновых конъюгатов, у лиц 1-й группы имело тенденцию к более высоким значениям ( $0,28 \pm 0,05$ ), чем у пациентов 2-й группы ( $0,23 \pm 0,03$ ), так же как и конъюгированных триенов (E278  $0,02 \pm 0,006$  и  $0,01 \pm 0,003$  ед. опт. пл. соответственно,  $p > 0,05$ ). Достоверных межгрупповых различий величины соотношения E278/206 ( $0,05 \pm 0,01$  и  $0,08 \pm 0,03$  соответственно,  $p > 0,05$ ) для конъюгированных триенов не найдено. Обнаружена прямая связь между числом нейтрофилов в индуцированной мокроте и содержанием диеновых конъюгатов (E233) в КВВ ( $r=0,47$ ;  $p=0,015$ ), а также E233/E206 ( $r=0,46$ ;  $p=0,018$ ).

### Обсуждение

Генерация АФК и АФГ, обусловленная синтезируемыми в гранулоцитах и экспортируемыми в экстрацеллюлярное пространство пероксидазами и другими окислительными ферментами, может быть рассмотрена в качестве причины деструкции бронхиального эпителия. Отсюда логично предположить, что холод- и осмоиндуцированная мобилизация гранулоцитарных пероксидаз в бронхах больных БА является приоритетным фактором, потенцирующим деструкцию и цитоллиз эпителия.

Как следует из данных о текущих деструктивно-цитолитических процессах (см. таблицу), эпителиальные клетки бронхов больных 1-й группы характеризовались значительно более выраженной деструкцией, чем клетки больных 2-й группы. В 1-й группе насчитывалось большее количество эпителиоцитов I и II классов деструкции, а также обнаруживалась тенденция к более высокому, чем во 2-й группе, содержанию клеток со значительным повреждением ядра и полным

распадом цитоплазмы (III класс деструкции) и тотально разрушенных клеток (IV класс деструкции). Количество эпителиоцитов, сохранивших неповрежденную структуру ядра и цитоплазмы (0 класс деструкции), было больше во 2 группе.

Усиленная продукция гем-содержащих пероксидаз причастна не только к интенсификации деструкции бронхиального эпителия, но и к активации окислительной модификации липидов, что было найдено у больных с гиперреактивностью на холодовой и гиперосмолярный стимулы. Основанием для такого утверждения служит положение о свободнорадикальном механизме генерации продуктов ПОЛ путем образования диеновых конъюгатов и гидропероксидов, благодаря взаимодействию первичных АФГ с ненасыщенными связями ацильных цепей фосфолипидов [17]. Роль инициирующего звена АФГ-индуцированного ПОЛ отводится реакции хлорноватистой кислоты (HOCl) с гидропероксидной группой, всегда содержащейся в ненасыщенном липиде в результате его естественного окисления, с образованием пероксильных радикалов, трансформирующихся в алкоксильные радикалы [9, 17]. Доказано, что миелопероксидаза в присутствии своих субстратов ( $H_2O_2$  и  $Cl^-$ ) разрушает гидропероксид с образованием О-центрированных радикалов, идентифицированных как пероксильный и алкоксильный [9]. В случае с гидропероксидом жирной кислоты допущена возможность образования, помимо О-центрированных радикалов, некоторого количества синглетного кислорода [9]. Ингибиторный анализ с использованием «ловушек» HOCl, перехватчиков свободных радикалов и ингибиторов миелопероксидазы показал, что разрушение гидропероксидной группы в присутствии изолированной миелопероксидазы или активированных нейтрофилов обусловлено непосредственной работой фермента, что позволило сделать вывод о зависимом от пероксидазы HOCl-индуцированном ПОЛ [9, 18].

На основании полученных данных можно предположить, что активация пероксидазной функции гранулоцитов при реакции дыхательных путей на ИГХВ и ИГР потенцирует нейтрофильный респираторный взрыв, приводящий к персистенции воспаления, эпителиальной деструкции, ремоделированию бронхов, а также стимулирует ПОЛ, которое, осуществляя регуляцию мембранной структуры гранулоцитов и бронхиального эпителия, в свою очередь, способствует апоптозу эпителиоцитов и высвобождению медиаторов воспаления при разрушении клеточных мембран.

Известно, что с дезинтеграцией эпителиального пласта связано развитие бронхоспастической реакции вследствие стимуляции суб-

интраэпителиально расположенных нервных окончаний – С-волокон, координированных с неадренэргическими/нехолинэргическими ганглиями «третьей» сигнальной нервной системы (NANC), играющей особую роль при БА [2]. Проведение нервного импульса по С-волокам вызывает экзототоз субстанции Р и нейрокининов А и В – нейротрансмиттеров с бронхоконстрикторным и вазодилаторным эффектами. Последние активируют тучные клетки, макрофаги, Т- и В-лимфоциты, усиливают сосудистую адгезию, являются хемотаксантами для эозинофилов и нейтрофилов. Окислительное повреждение эпителия приводит к ингибированию синтезируемого нейросекреторными клетками вазоактивного интестинального пептида, нарушению выработки простагландина  $E_2$ , экспрессии поверхностных клеточных рецепторов, провоспалительных цитокинов, хемотаксантов, GM-CSF [2].

По данным ряда авторов, бронхоальвеолярная лаважная жидкость больных БА отличается, по сравнению со здоровыми лицами, повышенным содержанием особого фенотипа антиген-презентирующих дендритных клеток, характеризующегося высокой степенью экспрессии молекул МНС II класса, что свидетельствует об активации дендритных клеток, ассоциированной с гиперпродукцией IL-4 и IL-5 [2]. В иммунном ответе при аллергической астме прослеживается приверженность бронхиального эпителия к отдельной популяции дендритных клеток, избирательно направляющей дифференцировку Th0-лимфоцитов по Th2-пути с экспрессией рецептора тирозиновых киназ CD117 (c-kit) в качестве мембранного маркера [19, 20]. Вместе с тем доказано, что эпителиальные клетки из бронхобиоптатов, полученных от больных с БА, отличаются значительным усилением продукции GM-CSF и экспрессии провоспалительных IL-6, IL-8, резко возрастающей под воздействием поллютантов [21].

## Заключение

У больных БА с холодовой и гиперосмолярной гиперреактивностью дыхательных путей изменения в структуре эпителия и структурно-функциональном профиле гранулоцитов сопряжены с активацией пероксидазной функции гранулоцитов и взаимосвязаны со стимулированным прооксидантами ПОЛ как в эпителии, так и в гранулоцитах. Рост количества гранулоцитов в воспалительном инфильтрате, признаки активации деструкции эпителия и накопление вторичных продуктов ПОЛ в дыхательных путях у этих больных сопровождаются более выраженными клинико-функциональными проявлениями болез-

ни – ограничением воздушного потока и утратой контроля над астмой.

## Список литературы / References

1. Соодаева С.К. Свободнорадикальные механизмы повреждения при болезнях органов дыхания. *Пульмонология*. 2012; 22 (1): 5–10. doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-1-5-10
2. Soodaeva S.K. Free radical mechanisms of injury in respiratory disease. *Pul'monologiya = Russian Pulmonology*. 2012; 1: 5–10. [In Russian]. doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-1-5-10
3. Конищева А.Ю., Гervазиева В.Б., Лаврентьева Е.Е. Особенности структуры и функции респираторного эпителия при бронхиальной астме. *Пульмонология*. 2012; 22 (5): 85–91. doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-5-85-91
4. Konishcheva A.Yu., Gervazieva V.B., Lavrentyeva E.E. Changes in structure and function of respiratory epithelium in bronchial asthma. *Pul'monologiya = Russian Pulmonology*. 2012; 22 (5): 85–91. [In Russian]. doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-5-85-91
5. Ofman G., Tipple T.E. Thiol-redox regulation in lung development and vascular remodeling. *Antioxid. Redox Signal.* 2019; 31 (12): 858–873. doi: 10.1089/ars.2018.7712
6. Wang Y., Mao G., Lv Y., Huang Q., Wang G. MicroRNA-181b stimulates inflammation via the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway *in vitro*. *Exp. Ther. Med.* 2015; 10 (4): 1584–1590. doi: 10.3892/etm.2015.2702
7. Маянский А.Н., Маянский Н.А., Заславская М.И. Нуклеарный фактор- $\kappa$ B и воспаление. *Цитокины и воспаление*. 2007; 6 (2): 3–9.
8. Mayansky A.N., Mayansky N.A., Zaslavskaya M.I. Nuclear factor-kappa B and inflammation: activation and regulation. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*. 2007; 6 (2): 3–9. [In Russian].
9. 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. *Молекул. мед.* 2013; 2: 24–32.
10. 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 = Molecular Medicine*. 2013; 2: 24–32. [In Russian].
11. Naumov D.E., Perelman J.M., Kolosov V.P., Potapova T.A., Maksimov V.N., Zhou X. Transient receptor potential melastatin 8 gene polymorphism is associated with cold-induced airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. *Respirology*. 2015; 20 (8): 1192–1197. doi: 10.1111/resp.12605
12. Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И., Огородова Л.М., Селиванова П.А., Дзюман А.Н. Цитоморфологический анализ ремоделирования бронхиальной стенки при различных типах бронхиальной астмы. *Клин. мед.* 2012; 90 (2): 24–27.
13. Gereng E.A., Sukhodolo I.V., Pleshko R.I., Ogorodova L.M., Selivanova P.A., Dzyuman A.N. Cytomorphological analysis of remodeling of the bronchial wall in different types of bronchial asthma. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Meditsine*. 2012; 90 (2): 24–27. [In Russian].
14. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах. *Успехи биол. химии*. 2013; 53: 195–244.
15. Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Biochemistry (Moscow)*. 2013; 78: 1466–1489.
16. WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2018. Available at: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>
17. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (2019 update). Available at: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org)
18. Перельман Ю.М., Приходько А.Г. Методика комбинированной диагностики нарушений кондиционирующей функции и холодовой гиперреактивности дыхательных путей. *Бюл. физиол. и патол. дыхания*. 2002; (12): 22–28.
19. Perelman J.M., Prikhodko A.G. Combined diagnostics technique of assessing conditioning function and cold hyperreactivity of respiratory tract. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration*. 2002; (12): 22–28. [In Russian].
20. Перельман Ю.М., Наумов Д.Е., Приходько А.Г., Колосов В.П. Механизмы и проявления осмотической гиперреактивности дыхательных путей. Владивосток: Дальнаука, 2016. 239 с.
21. Perelman J.M., Naumov D.E., Prikhodko A.G., Kolosov V.P. Mechanisms and manifestations of osmotic airway hyperresponsiveness. Vladivostok: Dal'nauka, 2016. 239 p. [In Russian].
22. Матвеева Л.А. Местная защита респираторного тракта у детей. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1993. 276 с.
23. Matveeva L.A. Local protection of the respiratory tract in children. Tomsk, 1993. 276 p. [In Russian].
24. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 320 с.
25. Hauhoe F.G.J., Quagliano D. Hematologic cytochemistry. Moscow: Meditsina, 1983. 320 p. [In Russian].
26. Ульянычев Н.В. Системность научных исследований в медицине. Saarbrücken: LAP LAMBERT, 2014. 140 с.



Ul'yanychev N.V. Systematic research in medicine. Saarbrücken: LAP LAMBERT, 2014. 140 p. [In Russian].

17. Kawai Y., Kiyokawa H., Kimura Y., Kato Y., Koichiro Ts., Terao J. Hypochlorous acid-derived modification of phospholipids: characterization of amino-phospholipids as regulatory molecules for lipid peroxidation. *Biochemistry*. 2006; 45: 14201–14211. doi: 10.1021/bi0610909

18. Snelgrove R.J., Patel D.F., Patel T., Lloyd C.M. The enigmatic role of the neutrophil in asthma: Friend, foe or indifferent? *Clin. Exp. Allergy*. 2018; 48 (10): 1275–1285. doi: 10.1111/cea.13191

19. Krishnamoorthy N., Oriss T. B., Paglia M., Fei M., Yarlagadda M., Vanhaesebroeck B., Ray A., Ray P. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat. Med.* 2008; 14 (5): 565–573. doi: 10.1038/nm1766

20. Lim H.F., Nair P. Airway inflammation and inflammatory biomarkers. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2018; 39 (1): 56–63. doi: 10.1055/s-0037-1606217

21. 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

#### **Сведения об авторах:**

**Алексей Борисович Пирогов**, к.м.н., ORCID: 0000-0001-5846-3276, e-mail: dncfpd@dncfpd.ru

**Анна Григорьевна Приходько**, д.м.н., ORCID: 0000-0003-2847-7380, e-mail: prih-any@ya.ru

**Юлий Михайлович Перельман**, д.м.н., профессор, член-корр. РАН, ORCID: 0000-0002-9411-7474, e-mail: jperelman@mail.ru

#### **Information about the authors:**

**Aleksey B. Pirogov**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-5846-3276, e-mail: dncfpd@dncfpd.ru

**Anna G. Prikhodko**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0003-2847-7380, e-mail: prih-any@ya.ru

**Juliy M. Perelman**, doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS, ORCID: 0000-0002-9411-7474, e-mail: jperelman@mail.ru

*Поступила в редакцию 08.10.2020*

*После доработки 09.11.2020*

*Принята к публикации 06.02.2021*

*Received 08.10.2020*

*Revision received 09.11.2020*

*Accepted 06.02.2021*