

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.248:616-008.854/.855:612.014.462.1

## ВОСПАЛИТЕЛЬНО-КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЫ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С РАЗНЫМИ ТИПАМИ РЕАКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ НА ГИПЕРОСМОЛЯРНЫЙ СТИМУЛ

А.Б.Пирогов<sup>1</sup>, А.Г.Приходько<sup>1</sup>, Ю.М.Перельман<sup>1</sup>, С.В.Зиновьев<sup>2</sup>, Д.Е.Наумов<sup>1</sup>, Е.Ю.Афанасьева<sup>1</sup>

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

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

### РЕЗЮМЕ

В работе исследовали клеточный состав индуцированной мокроты у 52 больных бронхиальной астмой легкого, частично контролируемого течения. По результатам реакции на ультразвуковую ингаляцию гипертонического раствора хлорида натрия больные были объединены в группы: с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмотический стимул (1 группа, 19 больных) и с отсутствием реакции на бронхопровокацию (2 группа, 33 больных). Контрольную группу составили 12 практически здоровых лиц. С помощью среднего цитохимического коэффициента определялось содержание в лейкоцитах мокроты нейтрофильной и эозинофильной миелопероксидазы. Подсчитывались индекс деструкции и показатель интенсивности цитолиза лейкоцитов. В цитограмме индуцированной мокроты больных бронхиальной астмой было увеличено число лейкоцитов и уменьшено число макрофагов по сравнению со здоровыми лицами. Цитограмма мокроты больных 1 группы соответствовала смешанному нейтрофильно-эозинофильному фенотипу с преобладанием нейтрофилов, наибольшей десквамацией эпителия, доминированием интенсивности цитолиза нейтрофилов на фоне максимального среднего цитохимического коэффициента нейтрофильной миелопероксидазы. Найдена тесная прямая связь между количеством нейтрофилов и содержанием в них миелопероксидазы у больных 1 группы. Показано значение цитологических показателей, уровня внутриклеточной нейтрофильной миелопероксидазы и интенсивности цитолиза нейтрофилов в качестве маркеров формирования бронхоспастической реакции на гиперосмолярный стимул

при астме.

*Ключевые слова:* гиперреактивность бронхов, гиперосмолярность, нейтрофильно-эозинофильный фенотип воспаления, миелопероксидаза, эозинофильная пероксидаза, цитолиз.

### SUMMARY

#### INFLAMMATORY-CELLULAR COMPOSITION OF THE INDUCED SPUTUM IN PATIENTS WITH ASTHMA WITH DIFFERENT TYPES OF AIRWAY RESPONSE TO HYPEROSMOLAR STIMULUS

A.B.Pirogov<sup>1</sup>, A.G.Prikhodko<sup>1</sup>, J.M.Perelman<sup>1</sup>, S.V.Zinov'ev<sup>2</sup>, D.E.Naumov<sup>1</sup>, E.Yu.Afanas'eva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str.,

Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

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

The cellular composition of the induced sputum in 52 patients with mild partially controlled asthma was studied. By the results of the response to ultrasound inhalation with NaCl hypertonic solution the patients were divided in two groups: the first one had the patients with airway hyperresponsiveness to hyperosmolar stimulus (19 patients) and the second one had those who had no response to bronchial challenge (33 patients). The control group included 12 healthy people. With the help of mean cytochemical coefficient the contents of neutrophilic and eosinophilic myeloperoxidase in the sputum leucocytes were identified. The index of destruction and the parameter of intensiveness of leucocytes cytolysis were calculated. In the cytogram of the induced sputum of asthmatics there was an increase of leucocytes number and a decrease of macrophages

**number in comparison with healthy people. Cytogram of the sputum of patients of the first group corresponded to the mixed neutrophilic-eosinophilic phenotype with the domination of neutrophils, the biggest desquamation of epithelium, domination of intensiveness of neutrophils cytolysis against maximal mean cytochemical coefficient of neutrophilic myeloperoxidase. A close correlation was found between the number of neutrophils and the contents of myeloperoxidase in them in the patients of the first group. The significance of cytological parameters, of the level of intracellular neutrophilic myeloperoxidase and intensiveness of neutrophils cytolysis as the markers of response to hyperosmolar stimulus in asthma was shown.**

*Key words: bronchial hyperresponsiveness, hyperosmolarity, neutrophilic-eosinophilic phenotype of bronchial inflammation, myeloperoxidase, eosinophilic peroxidase, cytolysis.*

Известно, что, в отличие от респираторного тракта здорового человека, у больных бронхиальной астмой (БА) имеется высокая лабильность дыхательных путей, приводящая к спастической реакции при воздействии экзогенных стимулов [13]. Одним из факторов, провоцирующих бронхоспазм, служит нарушение осмолярности внутрибронхиальной среды, сопровождающееся изменением осмотического градиента и ионного состава перилимфарной жидкости многоядного мерцательного эпителия, активацией тучных клеток интерстиция, секрецией нейротрансмиттеров, гистамина и цитокинов [1, 8, 18]. Важная роль в формировании более выраженной реакции дыхательных путей на осмотический стимул и утрате контроля над заболеванием отводится метаболитам оксидативного стресса, в частности, недоокисленным продуктам перекисного окисления липидов (ПОЛ) [8].

Общий патофизиологический механизм развития бронхоспастической реакции в ответ на действие гипои гиперосмолярного триггеров базируется на высвобождении провоспалительных медиаторов тучными клетками [19]. При действии гиперосмолярного стимула происходит повышение осмолярности перилимфарной жидкости и увеличение вязкости мокроты вследствие образования дисульфидных водородных связей между молекулами муцина, их полимеризации с возрастанием гидрофобности мокроты и изменением соотношения фракций золя и геля в сторону последнего [5, 14]. Согласно концепции о ведущей роли оксидативного стресса в патогенезе бронхоспазма [5, 8], указанные события связывают с агрессивным действием активных форм кислорода, приводящих к необратимым изменениям биологически важных молекул в эпителии и соединительной ткани – белков, липидов, гликопротеинов, нуклеиновых кислот, разрушению биомембран [5, 14, 15, 19].

Оксидативный стресс активно реализуется ферментом азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидазой (МПО), секретируемой стимулированными (праймированными) клетками при дегрануляции [2, 28]. МПО служит биомаркером воспаления бронхов у

больных БА с гиперреактивностью дыхательных путей к холодному стимулу [9]. В количестве 2-5% от общего клеточного белка нейтрофилов МПО входит в семейство гемсодержащих пероксидаз (донор:  $H_2O_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.7), к которому относится и очень близкая к МПО по функционально-ферментативным свойствам эозинофильная пероксидаза, содержащаяся в матриксе вторичных (специфических) гранул эозинофилов, составляя примерно 5% от общего белка этих гранул [6, 25].

Каскад свободнорадикальных реакций находит своё клиническое выражение в бронхообструкции, нарушении мукоцилиарного клиренса, активации кашлевого рефлекса и возрастании риска инфицирования дыхательных путей [5]. В клинико-экспериментальных исследованиях у больных БА с гиперреактивностью бронхов к осмотическому стимулу после проведения бронхопровокационных проб возникали непродуктивный кашель, затруднение дыхания, ощущение диспноэ, осиплость и першение в горле, нарушение носового дыхания [1]. Указанные симптомы раздражения дыхательных путей присутствовали у 61% больных после провокации гипотоническим раствором, в 63% случаев – после ингаляции гипертонического раствора, в 13% – после физической нагрузки [1]. Приступообразный кашель, появляющийся по окончании бронхопровокации, в большей степени выраженности отмечался у больных с повышенной чувствительностью бронхов к гипертоническому раствору [1].

Вследствие того, что осмозависимые бронхоспастические реакции среди больных БА довольно распространены и могут служить причиной неконтролируемого течения заболевания [1, 10–12], представляет интерес изучение их патогенеза в аспекте взаимосвязи основных патогенетических звеньев – оксидативного стресса и воспаления, развивающихся в бронхах.

Целью настоящей работы явилось изучение цитоморфологической картины и активности нейтрофильной и эозинофильной МПО бронхиального воспалительного секрета у больных БА с гиперреактивностью дыхательных путей на гипертонический стимул.

#### Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 52 больных БА легкой степени тяжести частично контролируемого и неконтролируемого течения в соответствии с критериями GINA [23]. Контрольную группу составили 12 практически здоровых лиц. Пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания.

Дизайн исследования включал клинико-анамнестическое тестирование больных с оценкой контроля над заболеванием по валидизированному вопроснику Asthma Control Test (ACT, Quality Metric Inc., 2002),

проведение бронхопровокационной пробы путем ингаляции гипертонического (4,5%) раствора хлорида натрия (ИГР), сбор индуцированной мокроты (ИМ).

Бронхопровокационная проба с гипертоническим раствором осуществлялась при помощи ультразвукового ингалятора Thomex L-2 (Польша), средний диаметр частиц распыляемого аэрозоля – 3 мкм (диапазон диаметров частиц 0,5÷10,0 мкм), производительность 0÷4,5 см<sup>3</sup>/мин, производительность наддува 20 дм<sup>3</sup>/мин при стабилизированной температуре 37,3°C (310±4К), рабочая ёмкость сосуда для раствора – 30 см<sup>3</sup>. Исследование включало две последовательные ингаляции длительностью 3 мин каждая. Для первой ингаляции использовали 30 мл стерильного изотонического (0,9%) раствора NaCl, при второй – такое же количество 4,5% раствора NaCl. Объем и температура ингалируемых растворов были одинаковыми у всех пациентов. Общая доза аэрозоля, доставляемого каждому пациенту, была измерена до и после провокации. Контрольные исследования вентиляционной функции лёгких выполнялись по стандартной методике [7] на аппарате Easy on-PC (niddMedizintechnik AG, Швейцария) перед началом бронхопровокации, после ингаляции 0,9% NaCl, а также на 1-й и 5-й минутах восстановительного периода после ингаляции 4,5% раствора NaCl. Проба считалась положительной при падении ОФВ<sub>1</sub> после ИГР более, чем на 10% от исходного. По окончании провокационной пробы бронхоспазм купировали ингаляцией 2 доз аэрозоля β<sub>2</sub>-агониста короткого действия.

Сбор ИМ осуществлялся на следующий день после проведения пробы ИГР по стандартной методике и начинался с регистрации параметров вентиляционной функции лёгких, затем больному через дозированный аэрозольный ингалятор вводился сальбутамол в дозе 200 мкг. Индукция мокроты осуществлялась ингаляцией 3-, 4- и 5% раствора хлорида натрия с применением ультразвукового небулайзера (OMRON NE-U-17, Япония) сеансами по 5 минут, по завершении каждого сеанса определяли объем форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ<sub>1</sub>). При снижении ОФВ<sub>1</sub> более 10% от исходного значения и получении удовлетворительного образца мокроты ингаляцию прекращали. ИМ исследовали по общепринятой методике не позднее 2 часов после её получения [20].

В камере Горяева оценивалось количество клеток в единице нативного материала ИМ стандартным методом. Для уточнения клеточного состава 50 мкл ИМ наносили на предметные стекла, нагретые до температуры 37°C. Мазки изготавливались стандартным методом Кост и высушивались на воздухе в течение 5-10 минут при температуре 37°C путем помещения в вентилируемый термостат ТМ-2. После фиксации на протяжении 10 минут в парах 40% раствора формалина мазки окрашивались в 4-5% водном красителе Романовского-Гимза при рН 6,8.

Микропрепараты ИМ изучали при помощи светоптической иммерсионной микроскопии, с подсчётом 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 от общего количества клеток.

Цитохимическое исследование активности МПО нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов и в цитологических мазках ИМ проводилось с помощью метода Грэхема-Кнолля [17] с докраской мазков после обработки бензидином и перекисью водорода водным раствором азура-2. Изображения микропрепаратов переводили в цифровую форму с помощью аналоговой видеокамеры ДСМ 510 и системы захвата изображения. Для цифровой обработки изображений клеток использовали компьютерные программы Image Tool и Optika Vision Pro (Италия), Mac Biophotonics Image S (США). На основании данных, полученных с помощью программы для микроденсиметрии, по оптической плотности фермента в исследуемых клетках рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) МПО (в пикселях).

Степень и интенсивность процессов деструкции в нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитах определяли по методу Л.А.Матвеевой [3]. При этом учитывали особенности метода фиксации материала в парах формалина, создающего высокую клеточность препарата – до 40-50 клеток в поле зрения иммерсионного микроскопа.

В основе указанного метода лежит выделение пяти классов деструкции клеток в зависимости от измененной структурной целостности клеточных элементов.

Степень повреждения клеток вычисляли с помощью суммарного индекса деструкции клеток (ИДК). Индекс интенсивности цитолиза клеток (ИЦК) рассчитывали как отношение наиболее разрушенных клеток к содержанию остальных поврежденных клеток.

$$\text{ИДК} = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + n_4}{100}$$

$$\text{ИЦК} = \frac{n_4}{n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4}$$

где 0, 1, 2, 3, 4 – номера классов деструкции; n<sub>0</sub>, n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, n<sub>3</sub>, n<sub>4</sub> – количество клеток соответствующего класса.

По отношению индекса деструкции клеток к индексу их цитолиза (ИДК/ИЦК) оценивалась интенсивность цитолиза клеток.

Статистический анализ полученного материала проводился на основе стандартных методов вариационной статистики. Для определения достоверности различий использовали непарный критерий t (Стьюдента), в случаях негауссовых распределений – непараметрические критерии Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни. С целью определения степени связи между двумя случайными величинами проводили кор-

реляционный анализ, рассчитывали коэффициент корреляции (r). Для всех величин принимались во внимание уровни значимости (p) 0,05; 0,01; 0,001.

**Результаты исследования и их обсуждение**

По данным бронхопровокационной пробы пациенты были разделены на две группы: с гиперреактивностью дыхательных путей на ИГР (1 группа, 19 человек) и отсутствием реакции на ИГР (2 группа, 33 человека). При оценке бронхиальной проходимости по данным спирографии не было найдено достоверных различий ОФВ<sub>1</sub> у пациентов исследуемых групп, в то же время были обнаружены достоверно более низкие значения МОС<sub>25-75</sub>, характеризующего дистальные

бронхи, у лиц, реагирующих на осмотический стимул (табл. 1). Кроме того, по данным анкетного опроса, уровень контроля над заболеванием у больных 1 группы был существенно ниже, чем у пациентов 2 группы.

В результате изучения воспалительно-клеточного состава мокроты у пациентов обеих групп установлено статистически значимое по сравнению с контролем увеличение числа основных эффекторов бронхиального воспаления – как эозинофилов, так и нейтрофилов (табл. 2). При этом прирост нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов у больных БА в 1 группе был достоверно выше, чем во 2 группе.

**Таблица 1**

**Сравнительная клиническая характеристика пациентов исследуемых групп (M±m)**

Показатели	1 группа	2 группа	p
Возраст	39,8±1,7	40,9±1,2	>0,05
АСТ, баллы	16,8±0,8	19,2±0,8	<0,05
ОФВ <sub>1</sub> , % долж.	91,5±2,6	93,6±2,2	>0,05
МОС <sub>25-75</sub> , % долж.	55,4±3,3	83,6±1,23	<0,05
ΔОФВ <sub>1</sub> , %	-17,3±1,6	-1,5±0,6	<0,001

*Примечание:* здесь и далее p – достоверность различий показателей между 1 и 2 группами.

**Таблица 2**

**Клеточный состав (в %) индуцированной мокроты (M±m)**

Группы	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты	Эпителий
1 группа	40,2±4,3***	30,5±4,0***	29,0±4,3***	2,3±0,5	1,3±0,4
2 группа	29,7±3,9** p<0,05	15,3±3,3*** p<0,01	50,0±4,2*** p<0,01	3,1±0,6	0,9±0,5
Контроль	11,6±0,70	0,1±0,08	84,8±0,9	2,4±0,3	0,9±0,2

*Примечание:* здесь и далее звёздочкой отмечена достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой (\* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001).

Активность пероксидаз гранулоцитов заметно превалировала у астматиков над здоровыми лицами. Максимальная величина СЦК МПО была зарегистрирована в 1 группе (148,4±7,1 пикселей), достоверно превышая значения во 2 группе (89,1±7,8 пикселей; p<0,001) и группе контроля (84,8±4,1 пикселей; p<0,001). Таким образом, синтез МПО в лейкоцитах ИМ у больных с осмотической гиперреактивностью бронхов был существенно выше, чем в группах сравнения.

Анализируя состав остальных клеток воспаления в ИМ, следует подчеркнуть, что у больных БА по сравнению со здоровыми лицами наблюдалось характерное для астмы снижение количества макрофагов, которое превалировало у пациентов 1 группы. Нами не найдено различий в содержании лимфоцитов среди больных и здоровых лиц, однако у лиц с гиперреактивностью на ИГР отмечалась тенденция к увеличению числа десквамированных бронхиальных эпителиоцитов. Усиленная десквамация эпителиальных клеток могла быть связана с цитотоксическим по отношению к ним дей-

ствием катионных протеинов эозинофилов, в том числе пероксидазы [21, 22, 26], так как последняя способна непосредственно связываться с отрицательно заряженной плазматической мембраной клеток-мишеней [21]. Такая связь может приводить к утрате извлекаемого из эпителиоцитов фактора релаксации [22], десквамации и дисфункции респираторного эпителия при астме [26]. У больных 1 группы имел место более выраженный прирост эозинофильного компонента и клеточной пероксидазной активности в мокроте и, следовательно, в воспалительном инфильтрате. Можно предположить, что высокий уровень эозинофилов и пероксидазы цитоплазматических гранул, как фактор разрушения эпителиального барьера и развития респираторной дисфункции [26], индуцирует формирование чрезмерной реакции бронхов на ИГР.

Фенотипической особенностью цитограммы ИМ у пациентов с гиперреактивностью бронхов на гиперосмолярный стимул является не только наличие высокой доли эозинофилов, но и нейтрофилов. Данный цитологический фенотип относится к смешанному

нейтрофильно-эозинофильному и имеет признаки сходства с нейтрофильно-эозинофильным воспалительным паттерном дыхательных путей у больных БА с гиперэргической реакцией на холодовой триггер [9, 27], тогда как у больных БА с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул цитологический паттерн носит эозинофильно-нейтрофильный характер [10].

При анализе уровня деструкции и цитолиза эозинофилов и нейтрофилов ИМ в обеих группах больных в тканях бронхов наблюдались явления активации нарушений структурной целостности и распад клеточных элементов мокроты (табл. 3). Происходящая при этом секреция МПО из цитоплазмы во внеклеточную среду была направлена на инициацию и поддержание воспаления [2] путем включения ферментов в каскад окислительных реакций и эскалацию оксидативного стресса. Это происходило благодаря тому, что МПО обладают уникальным свойством катализировать окисление галогенидов, таких как Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, с образова-

нием чрезвычайно высоко реакционноспособных гипогалогенидов, в большей степени – HOCl [2, 6]. Галогенсодержащие реагенты (АФГ), или активные формы галогенов (в частности, ионизированная форма HOCl – гипохлорит), наряду с активными формами кислорода, способны модифицировать активность ядерного транскрипционного фактора NF-κB с последующей стимуляцией экспрессии генов провоспалительных цитокинов [6, 14, 24]. Окислительной модификацией белков обусловлено появление у них антигенных свойств, тогда как окисление липидов приводит к появлению хемоаттрактантов, которые, в свою очередь, увеличивают миграцию фагоцитов к месту их образования [15]. Окислительное повреждение белков и гликопротеинов, реализуемое через АФГ, изменяет активность рецепторов и активирует окислительно-восстановительные и гидролитические ферменты. В результате реакций окисления галогенидов развивается ПОЛ [25], вызывающее воспалительные процессы экссудации и инфильтрации в дыхательных путях [5, 14].

Таблица 3

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

Группы	Эозинофилы		Нейтрофилы	
	ИДК	ИДК/ИЦК	ИДК	ИДК/ИЦК
1 группа	0,42±0,02**	0,34±0,03***	0,41±0,02*	0,44±0,02***
2 группа	0,45±0,02**	0,32±0,02***	0,47±0,02** p<0,05	0,31±0,02*** p<0,001
Контроль	0,22±0,06	0,08±0,006	0,19±0,09	0,11±0,007

Морфологической манифестацией развития воспаления и формирования бронхообструкции у больных исследуемых групп являлись признаки деструктивно-некротических процессов в лейкоцитах ИМ, отраженные в показателях ИДК и ИДК/ИЦК, статистически достоверно превосходящих контрольные. Если в группе больных, не имевших реакции на гипертонический стимул, более значимыми были деструктивные изменения эозинофилов и нейтрофилов, опосредующие экзоцитоз содержащих фермент гранул, то у пациентов с гиперреактивностью дыхательных путей на ИГР индексы деструкции эозинофилов и нейтрофилов были равнозначно высокими. Кроме того, у больных 1 группы нами были получены достоверно более высокие значения ИДК/ИЦК нейтрофилов, по сравнению со 2 группой при минимальных межгрупповых различиях в ИДК/ИЦК эозинофилов.

Как известно, цитолиз является одним из вариантов высвобождения провоспалительных ферментов из лейкоцитов, существуя в этом качестве наряду с клеточной дегрануляцией [25]. Одновременно цитолиз ассоциируется с воздействием вредоносных факторов, приводящих к нарушению целостности клеточной мембраны, изоляцией клетки от её окружения с последующим развитием или прогрессированием воспаления [4]. Отмечено, что некротический путь гибели лейкоцитов играет ведущую роль в различные периоды

течения БА, а некротический индекс клеток ИМ преобладает над апоптотическим, за исключением обострения болезни, когда показатели апоптоза и некроза клеток практически одинаковы [4].

Следовательно, у лиц с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул интенсивность цитолиза нейтрофилов может служить маркером ускоренных процессов некроза и гибели клеток, сопряженных с повышением продукции и выброса МПО. Скорее всего, у этих больных имеется более высокая окислительная пероксидазная активность, превосходящая пероксидазную активность лейкоцитов в тканях бронхов больных, не имеющих реакции на ИГР. Данное утверждение подтверждается найденной корреляционной связью (r=0,91; p<0,001) между количеством нейтрофилов в составе ИМ и уровнем внутриклеточного содержания пероксидазы (СЦК МПО) у больных БА с положительной реакцией на ИГР.

Из всего спектра исследованных параметров путём дискриминантного анализа [16] были выделены те, которые в большей степени характеризуют воспалительный паттерн пациентов с гиперреактивностью дыхательных путей на гипертонический раствор и могут быть использованы в качестве маркеров диагностики. Построено дискриминантное уравнение, основанное на интегральной оценке количественных показателей содержания нейтрофилов (нейтр., %),

эозинофилов (эозин, %) и СЦК нейтрофильной миелопероксидазы (МПО) индуцированной мокроты:

$$D = 0,3 \text{ нейтр.} + 0,4 \text{ эозин.} + 0,3 \text{ МПО,}$$

где  $D$  – дискриминантная функция с граничным значением 63,5, позволяющая диагностировать наличие или отсутствие гиперреактивности к гиперосмолярному стимулу. При  $D$  равной или большей граничного значения диагностируется появление реакции на гипертонический стимул, при  $D$  меньшей граничного значения диагностируется её отсутствие. Вероятность ошибочной классификации равна 12,91%.

Высокие уровни субпопуляции нейтрофилов, активности синтезируемой нейтрофильной МПО и интенсивности цитолиза нейтрофилов с целью нарастания транспорта фермента в экстрацеллюлярную среду характеризуют отличительные черты фенотипа воспаления при гиперреактивности дыхательных путей к гиперосмолярному стимулу. Фенотипирование цитограммы мокроты в данном случае актуально для формирования эндотипа болезни и связанного с ним изучения патофизиологических аспектов и патогенетической терапии астмы. Кроме того, оно позволяет прогнозировать реакцию больных на лечение и оценить динамику развития БА.

### Выводы

1. Фенотип цитограммы ИМ больных БА с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул является смешанным нейтрофильно-эозинофильным.
2. Количество десквамированного респираторного эпителия в мокроте больных с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул связано с высоким уровнем пероксидазной активности в лейкоцитах.
3. Нейтрофильные лейкоциты мокроты больных с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул обладают наиболее высоким показателем интенсивности цитолиза клеток.
4. Уровень МПО в цитоплазме нейтрофильных лейкоцитов и показатель интенсивности цитолиза нейтрофилов ИМ могут рассматриваться в качестве морфологических маркеров формирования бронхоспастической реакции на гиперосмолярный стимул при БА.

*Исследование поддержано Российским научным фондом (грант №14-25-00019).*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Сравнительная характеристика клинических и функциональных особенностей формирования гипо- и гиперосмолярной реактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой / Е.Ю.Афанасьева, А.Г.Приходько, Ю.М.Перельман, Л.Г.Нахамчен // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2015. Вып.56. С.8–13.
2. Функциональная активность нейтрофилов при сахарном диабете и ишемической болезни сердца: роль миелопероксидазы в развитии окислительного стресса / И.В.Горудко, В.А.Костевич, А.В.Соколов, Е.В.Ша-

мова, И.В.Буко, Е.Э.Константинова, В.Б.Васильев, С.Н.Черенкевич, О.М.Панасенко // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2012. Т.154, №7. С.28–32.

3. Матвеева Л.А. Местная защита респираторного тракта у детей. Томск: изд-во Том. ун-та, 1993. 276 с.

4. Роль процессов клеточной гибели в развитии воспаления при бронхиальной астме / В.А.Невзорова, С.А.Пазыч, Д.А.Бархатова, В.А.Кудрявцева // Тихоокеанский мед. журн. 2006. №2. С.54–58.

5. Никитина Л.Ю., Петровский Ф.И., Соодаева С.К. Оксидативный стресс и бронхоспазм, вызванный физической нагрузкой в спорте высоких достижений: существует ли взаимосвязь? // Пульмонология. 2012. №5. С.99–104.

6. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Галогенирующий стресс и его биомаркеры // Вестник РАМН. 2010. №1. С.27–39.

7. Перельман Ю.М., Приходько А.Г. Spiroграфическая диагностика нарушений вентиляционной функции легких: пособие для врачей; издание 2-е, доп. Благовещенск, 2013. 44 с.

8. Роль оксидативного стресса в реакции дыхательных путей на гипоосмолярный стимул у больных бронхиальной астмой / Ю.М.Перельман, А.Г.Приходько, Е.А.Бородин, Е.В.Ушакова // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып.54. С.17–22.

9. Активность миелопероксидазы нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов индуцированной мокроты у больных бронхиальной астмой с холодовой бронхиальной гиперреактивностью / А.Б.Пирогов, С.В.Зиновьев, Ю.М.Перельман, Ю.О.Семиреч, Г.В.Семенова, А.В.Колосов // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып.53. С.50–56.

10. Клеточный профиль индуцированной мокроты, уровень миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы крови у больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул / А.Б.Пирогов, А.Г.Приходько, Ю.М.Перельман, С.В.Зиновьев, Е.В.Ушакова, Г.А.Макарова, Д.Е.Наумов // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2015. Вып.57. С.8–14.

11. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П. Гиперреактивность дыхательных путей. Владивосток: Дальнаука, 2011. 204 с.

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

13. Фенотипические различия и особенности воспаления у больных бронхиальной астмой с изолированной и сочетанной реакцией дыхательных путей на холодный воздух и дистиллированную воду / А.Г.Приходько, Ю.М.Перельман, А.Б.Пирогов, Е.А.Бородин, Е.В.Ушакова, Н.В.Ульянычев // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып.54. С.8–16.

14. Соодаева С.К., Климанов И.А. Нарушения окислительного метаболизма при заболеваниях респиратор-

ного тракта и современные подходы к антиоксидантной терапии // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2009. № 1. С.34–38.

15. Соодаева С.К. Свободнорадикальные механизмы повреждения при болезнях органов дыхания // Пульмонология. 2012. №1. С.5–10.

16. Использование дискриминантного анализа при разработке диагностических (прогностических) решающих правил / Н.В.Ульянычев, В.Ф.Ульянычева, В.П.Колосов, Ю.М.Перельман // Информатика и системы управления. 2009. №4. С.13–15.

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

18. Hyperosmolarity causes inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A / M.Abolhassani [et al.] // *Inflamm. Res.* 2008. Vol.57, №9. P.419–429.

19. Anderson S.D., Kippelen P. Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. Vol.122, №2. P.225–235.

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

21. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration / S.Baldus [et al.] // *J. Clin. Invest.* 2001. Vol.108, №12. P.1759–1770.

22. Human eosinophil major basic protein causes hyperreactivity of respiratory smooth muscle of the epithelium / N.A.Flavahan [et al.] // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988. Vol.138. №3. P.685–688.

23. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Updated 2015). URL: <http://www.ginasthma.com>.

24. Effects of exercise induced oxidative stress and antioxidant supplementation on NF-kB activation in peripheral mononuclear cells / Y.S.Jin [et al.] // *Korean J. Sports Med.* 2000. Vol.18, №2. P.261–270.

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

26. Control of mild to moderate asthma over 1-year with the combination of salmeterol and fluticasone propionate / B.Lundbäck [et al.] // *Respir. Med.* 2006. Vol.100, №1. P.2–10.

27. Cell composition of induced sputum in patients with uncontrolled asthma and its participation in the formation of cold hyperresponsiveness / T.A.Maltseva [et al.] // *Eur. Respir. J.* 2013. Vol.42, Suppl.57. P.401.

28. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation / R.Zhang [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol.277, №48. P.46116–46122.

## REFERENCES

1. Afanas'eva E.Yu., Prikhodko A.G., Perelman J.M., Nakhamchen L.G. Comparative characteristic of clinical and functional features of formation of hypo- and hyperosmolar airway responsiveness in patients with bronchial

asthma. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2015; (56): 8–13 (in russian).

2. Gorudko I.V., Kostevich V.A., Sokolov A.V., Shamova E.V., Buko I.V., E.E.Konstantinova, V.B.Vasil'ev, Cherenkevich S.N., Panasenko O.M. The functional activity of neutrophils in patients with diabetes and coronary heart disease: the role of myeloperoxidase in the development of oxidative stress. *Byulleten' ehksperimental'noy biologii i meditsiny* 2012; 154(7):28–32 (in russian).

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

4. Nevzorova V.A., Pazykh 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).

5. Nikitina L.Y., Petrovsky F.I., Soодаева S.K. Oxidative stress and exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes: does the interrelation exist? *Pulmonology* 2012; (5):99–104 (in russian).

6. Panasenko O.M., Sergienko V.I. Halogenizing stress and its biomarkers. *Vestnik Rossiyskoi Akademii meditsinskikh nauk – Annals of the Russian Academy of Medical Science* 2010; (1):27–39 (in russian).

7. Perelman J.M., Prikhodko A.G. Spirographic diagnosis of disorders of pulmonary ventilation function: a guide for physicians. Blagoveshchensk; 2013 (in russian).

8. Perelman J.M., Prikhodko A.G., Borodin E.A., Ushakova E.V. The role of oxidative stress in airway response to hyposmolar stimulus in patients with bronchial asthma. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2014; (54):17–22 (in russian).

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

10. Pirogov A.B., Prikhodko A.G., Perelman J.M., Zinov'ev S.V., Ushakova E.V., Makarova G.A., Naumov D.E. Cellular profile of the induced sputum, the level of myeloperoxidase and neutrophilic blood elastase in patients with bronchial asthma with airway hyperresponsiveness to hyposmolar stimulus. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration*. 2015; (57):8–14 (in russian).

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

12. 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 – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2014; (53):36–41 (in russian).

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

Borodin E.A., Ushakova E.V., Ul'yanychev N.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 – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2014; (54):8–16 (in russian).

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

15. Soodaeva S.K. Free radical mechanisms of injury in respiratory disease. *Pulmonology* 2012; 1:5–10.

16. Ul'yanychev N.V., Ul'yanycheva V.F., Kolosov V.P., Perelman J.M. Using discriminant analysis in the development of diagnostic (prognostic) decision rules. *Informatika i sistemy upravleniya* 2009; (4):13–15 (in russian).

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

18. Abolhassani M., Wertz X., Pooya M., Chaumet-Riffaud P., Guais A., Schwartz L. Hyperosmolarity causes inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A. *Inflamm. Res.* 2008; 57(9):419–429.

19. Anderson S.D., Kippelen P. Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 122(2):225–235.

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

21. Baldus S., Eiserich J.P., Mani A., Castro L., Figueroa M., Chumley P., Ma W., Tousson A., White C.R., Bullard D.C., Brennan M.L., Lulis A.J., Moore K.P., Free-

man B.A. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J. Clin. Invest.* 2001; 108(12):1759–1770.

22. Flavahan N.A., Slifmah N.R., Gleich G.J., Vanhoutte P.T. Human eosinophil major basic protein causes hyperreactivity of respiratory smooth muscle of the epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 138(3):685–688.

23. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Updated 2015). Available at: [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com).

24. Jin Y.S., Park K.K., Park J.Y., Kim M.J. et al. Effects of exercise induced oxidative stress and antioxidant supplementation on NF- $\kappa$ B activation in peripheral mononuclear cells. *Korean J. Sports Med.* 2000; 18(2):261–270.

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

26. Lundbäck B., Rönmark E., Lindberg A., Jonsson A.C., Larsson L.G., Pétavy F., James M. Control of mild to moderate asthma over 1-year with the combination of salmeterol and fluticasone propionate. *Respir. Med.* 2006; 100(1):2–10.

27. 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.

28. Zhang R., Brennan M.L., Shen Z., MacPherson J.C., Schmitt D., Molenda C.E., Hazen S.L. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(48):46116–46122.

Поступила 04.02.2016

Контактная информация

Алексей Борисович Пировов,

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](mailto: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](mailto:dncfpd@ramn.ru)