

ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ФИЗИОЛОГИИ
И ПАТОЛОГИИ ДЫХАНИЯ

**Ю.М. Перельман, Д.Е. Наумов,
А.Г. Приходько, В.П. Колосов**

**МЕХАНИЗМЫ И ПРОЯВЛЕНИЯ ОСМОТИЧЕСКОЙ
ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**



Владивосток
Дальнаука
2016

ББК 54.12
УДК 616.248:616-008.61
М55

Перельман Ю.М., Наумов Д.Е., Приходько А.Г., Колосов В.П. *Механизмы и проявления осмотической гиперреактивности дыхательных путей.* – Владивосток: Дальнаука, 2016. – 240 с. ISBN 978-5-8044-1627-1

В монографии представлены данные о механизмах влияния нарушений осмотического гомеостаза клетки на формирование ключевого признака бронхиальной астмы и ряда других болезней органов дыхания – гиперреактивности дыхательных путей. Особое внимание уделено роли катионных каналов семейства TRPV. Представлены данные ассоциативного анализа ряда однонуклеотидных полиморфизмов генов-кандидатов, кодирующих экспрессию каналов. Освещены вопросы взаимосвязи осмотической гиперреактивности дыхательных путей с характером клеточного воспаления бронхов, процессами перекисного окисления липидов и генерацией пулов цитокинов и других биологически активных сигнальных молекул. Обобщены результаты исследований о распространенности, характере клинических проявлений данного феномена, его взаимосвязи с течением и уровнем контроля бронхиальной астмы.

Книга предназначена для научных работников, врачей пульмонологов, врачей функциональной диагностики, клинических физиологов, студентов и аспирантов медицинских и биологических вузов.

Ил. 53, табл. 29, библи. 363.

Рецензенты: Луценко М.Т., академик РАН, доктор медицинских наук, профессор
Игнатова Г.Л., доктор медицинских наук, профессор

Утверждено к печати решением Ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (№6 от 27.10.2016 г.)

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00019).

© Перельман Ю.М., Наумов Д.Е.,
Приходько А.Г., Колосов В.П., 2016

ISBN 978-5-8044-1627-1

© Дальнаука, 2016

Federal Agency of Science Organizations
Federal State Budgetary Scientific Institution
**«Far Eastern Scientific Center of Physiology and
Pathology of Respiration»**

**Juliy M. Perelman, Denis E. Naumov,
Anna G. Prikhodko, Victor P. Kolosov**

**MECHANISMS AND AND MANIFESTATIONS OF
OSMOTIC AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS**

**Vladivostok
Dalnauka
2016**

Juliy M. Perelman, Denis E. Naumov, Anna G., Prikhodko, Victor P. Kolosov. *Mechanisms and Manifestations of Osmotic Airway Hyperresponsiveness.* Vladivostok: Dalnauka, 2016. – 240 p. ISBN 978-5-8044-1627-1

The monograph presents the data about the mechanisms of influence of disturbances of osmotic homeostasis of cells on the formation of airway hyperresponsiveness – key sign of asthma and the range of other respiratory diseases. The special attention is paid to the role of cation channels of TRPV family. The data of the associative analysis of single nucleotide polymorphisms of gene-candidates coding the expression of channels have been given. The questions of correlation of osmotic airway hyperresponsiveness and the character of the cellular bronchial inflammation, processes of lipid peroxidation and generation of cytokines pools and other biologically active signal molecules have been discussed. The results of the researches about the morbidity rate, the character of clinical manifestations of this phenomenon, its correlation with the course and the level of the control of asthma have been summed up.

The book is aimed at scientists, pulmonologists, functional diagnostics physicians, clinical physiologists, students and post graduate students of medical and biological universities.

53 illustrations, 29 tables, 363 references.

The study was supported by Russian Science Foundation (grant № 14-25-00019)

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Список основных сокращений</i>	8
<i>Введение</i>	9
<i>Глава 1. Методические приемы исследования осмотической реактивности дыхательных путей и критерии ее оценки</i>	12
<i>Глава 2. Клинико-функциональная характеристика осмотической реактивности дыхательных путей</i>	28
2.1. Особенности реакции дыхательных путей на ингаляцию дистиллированной воды у больных хроническими обструктивными болезнями органов дыхания	28
2.2. Особенности течения бронхиальной астмы у больных с изолированной и сочетанной реакцией дыхательных путей на гипоосмотический и холодовой стимулы	37
2.3. Характер взаимосвязи клинических проявлений и функциональных особенностей гипо- и гиперосмотической реактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой	44
2.4. Клинико-функциональные особенности реакции дыхательных путей на ингаляцию гипертонического раствора у больных бронхиальной астмой	53
2.5. Функциональная характеристика и клинические проявления реакции дыхательных путей на физическую нагрузку у больных бронхиальной астмой	61
<i>Глава 3. Молекулярные механизмы осмотической гиперреактивности дыхательных путей</i>	70
3.1. Понятие об осмотическом стрессе как защитной реакции клетки, его молекулярные механизмы	70
3.2. TRP-каналы как рецепторы осмотического давления – краткая структурно-функциональная характеристика	74

3.3. Возможные негативные последствия активации TRPV в аспекте респираторной патологии	78
3.4. Полиморфизм генов TRPV1, TRPV2 и TRPV4 и гиперреактивность дыхательных путей в ответ на осмотические стимулы	83
<i>Глава 4. Клеточные паттерны воспаления при осмотической гиперреактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой (А.Б. Пирогов)</i>	98
<i>Глава 5. Оксидативный стресс и осмотическая гиперреактивность дыхательных путей</i>	124
5.1. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе бронхиальной астмы и гиперреактивности дыхательных путей	125
5.2. Исследование биомаркеров оксидативного стресса	135
5.3. Динамика показателей перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха у здоровых лиц	144
5.4. Роль оксидативного стресса в реакции дыхательных путей на гипоосмолярный стимул у больных бронхиальной астмой	150
5.5. Роль пероксида водорода и цитокинов в формировании воспалительного паттерна у больных бронхиальной астмой с изолированной и сочетанной реакцией дыхательных путей на гипоосмотический и холодовой стимулы	155
5.6. Участие нейтрофильной миелопероксидазы в перекисном окислении липидов и формировании реакции дыхательных путей больных бронхиальной астмой на гипоосмолярный стимул	165
5.7. Миелопероксидаза лейкоцитов бронхов, перекисное окисление липидов и цитокины как маркеры оксида-	

тивного стресса и воспаления у больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул.	173
5.8. Роль эозинофильного компонента воспаления бронхов и перекисного окисления липидов у больных бронхиальной астмой в развитии реакции дыхательных путей на физическую нагрузку	191
<i>Заключение</i>	199
<i>Список литературы</i>	203

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГДП	- гиперреактивность дыхательных путей
АСТ	- Asthma Control Test
АФГ	- активные формы галогенов
АФК	- активные формы кислорода
ДФН	- дозированная физическая нагрузка
ЖЕЛ	- жизненная емкость легких
иГКС	- ингаляционные глюкокортикостероиды
ИГХВ	- изокапническая гипервентиляция холодным воздухом
ИГР	- ингаляция гипертонического раствора хлорида натрия
ИДВ	- ингаляция дистиллированной воды
ИДК	- индекс интенсивности цитолиза клеток
ИМ	- индуцированная мокрота
ИЦ	- индекс интенсивности цитолиза
КВВ	- конденсат выдыхаемого воздуха
МОС ₂₅	- мгновенная объемная скорость выдоха на уровне 25% ФЖЕЛ
МОС ₅₀	- мгновенная объемная скорость выдоха на уровне 50% ФЖЕЛ
МОС ₇₅	- мгновенная объемная скорость выдоха на уровне 75% ФЖЕЛ
МОС ₂₅₋₇₅	- средняя объемная скорость выдоха на уровне 25-75% ФЖЕЛ
МПО	- миелопероксидаза
ОНП	- однонуклеотидный полиморфизм
ООЛ	- остаточный объем легких
ОЕЛ	- общая емкость легких
ОФВ ₁	- объем форсированного выдоха за 1 секунду
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
ПОС	- пиковая объемная скорость форсированного выдоха
ПОФВ	- «поток-объем» форсированного выдоха
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
СРО	- свободно-радикальное окисление
СЦК	- средний цитохимический коэффициент
ФЖЕЛ	- форсированная жизненная емкость легких
ХОБЛ	- хроническая обструктивная болезнь легких
ЧД	- частота дыхания
ЧСС	- частота сердечных сокращений
SaO ₂	- насыщение крови кислородом

ВВЕДЕНИЕ

Под гиперреактивностью дыхательных путей понимают их свойство отвечать чрезмерной бронхоконстрикторной реакцией на экзогенные стимулы. Этот чрезвычайно распространенный патофизиологический феномен является облигатным признаком бронхиальной астмы, а также частым спутником других заболеваний легких: хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), острого и хронического бронхита, муковисцидоза, острых респираторных вирусных инфекций, аллергического ринита и др. Нередко встречается и асимптомная гиперреактивность дыхательных путей у здоровых лиц. По имеющимся в настоящее время представлениям выделяют врожденную и приобретенную, а также специфическую и неспецифическую гиперреактивность. Врожденная гиперреактивность дыхательных путей является генетически обусловленной, проявляется при контакте с соответствующими агентами и не исчезает при их удалении. Приобретенная – порождается действием аллергизирующих и провоспалительных агентов, при удалении которых она постепенно исчезает. В свою очередь, специфическая гиперреактивность дыхательных путей ассоциируется с действием аллергенов, имея в своей основе иммунные механизмы развития бронхоконстрикторной реакции, неспецифическая – с действием физических и химических факторов, опосредуемых функцией неселективных катионных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом семейства TRP.

Среди физических факторов среды, выполняющих функцию экзогенного триггера бронхоконстрикции, наиболее распространенными являются термический и осмотический стимулы. Ранее нами (А.Г. Приходько и соавт., 2011; D.E. Naumov et al., 2015) был подробно охарактеризован феномен холодовой гиперреактивности дыхательных путей. Наряду с низкой температурой воздуха, оказывающей существенное влияние на функциональное состояние дыхательной системы на значительной территории Северного полушария, большое

значение в поддержании внутрилегочного гомеостаза имеет влажность воздуха. Изменения влажности воздуха в условиях континентального климата имеют циклический характер, связанный с сезонами года. По имеющимся наблюдениям характер клинического течения хронических заболеваний легких, ассоциированных с гиперреактивностью дыхательных путей, и в первую очередь, бронхиальной астмы часто зависит от чередования влажных и сухих сезонов года, что дает основание предполагать особую роль осмотической гиперреактивности дыхательных путей в модулировании местного воспаления и клинических проявлений болезни.

При низкой влажности воздуха, а также при гипервентиляции (произвольной или связанной с интенсивной физической нагрузкой) происходит увеличение респираторных влагопотерь, дегидратация поверхностного слоя дыхательной трубки, приводящая к повышению его осмолярности в связи с увеличением концентрации ионов Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++} . Выход воды из клетки по осмотическому градиенту сопровождается внутриклеточным стрессом, стимулирующим воспалительные каскады с повышенным образованием и выбросом во внеклеточную среду медиаторов воспаления (простагландины, лейкотриены, гистамин и др.), многие из которых обладают констрикторным действием на гладкую мускулатуру дыхательных путей. Противоположный процесс в стенке бронхов развивается при действии повышенной влажности воздуха или ингаляции гипоосмолярных растворов (дистиллированной воды). Гипергидратация поверхностного слоя приводит к диффузии воды в клетку по возникающему осмотическому градиенту, увеличению объема клетки и возникновению, в том числе, и механического стресса с дальнейшим выбросом медиаторов, способствующих бронхоконстрикции.

Генетические и многие клеточно-молекулярные механизмы данного процесса оставались до настоящего времени неизвестными. Предпринятые нами в последние несколько лет исследования, поддержанные Российским научным фондом, позволили существенно продвинуться на пути понимания природы этого феномена. Об осмо-

тической гиперреактивности дыхательных путей следует говорить, прежде всего, как о комплексном физиологическом нарушении, обусловленном и генотипическими, и фенотипическими особенностями. Исследование этиологических факторов, принимающих участие в формировании осмотической гиперреактивности дыхательных путей, определение главенствующих патофизиологических механизмов представляется весьма значимым для разработки стратегии диагностики, профилактики и лечения хронических болезней органов дыхания.

Представленная монография – попытка систематизировать полученные в ходе исследований последних лет знания и представления о некоторых патофизиологических механизмах формирования осмотической гиперреактивности дыхательных путей и их роли в формировании клинической картины болезни.

Настоящая монография является плодом напряженной работы большого коллектива. Авторы выражают глубокую признательность д.м.н., профессору Е.А. Бородину, к.м.н. А.Б. Пирогову, к.б.н. Э.В. Некрасову, к.м.н. Е.В. Ушаковой, к.м.н. М.И. Шматку, д.м.н. А.Н. Одирееву, Е.Ю. Афанасьевой и другим членам научного коллектива.

Исследования, положенные в основу данной монографии, были поддержаны Российским научным фондом (грант №14-25-00019), которому авторы выражают искреннюю благодарность.

Глава 1. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ И КРИТЕРИИ ЕЕ ОЦЕНКИ

Большинством исследователей гиперчувствительность дыхательных путей рассматривается как уменьшение порога чувствительности рецепторного аппарата бронхов к любым провокационным веществам, которое может быть зарегистрировано при воздействии их на соответствующие рецепторы (American Thoracic Society, 2000). Её определяют по пороговой (минимальной) концентрации (ПК) вводимого вещества, способной вызвать бронхоспастическую реакцию (уменьшение $ОФВ_1$ на 20% и более) и обозначаемой как $ПК_{20}$ ($РС_{20}$).

Понятие «реактивность» включает взаимосвязь между силой воздействия и величиной последующей реакции, которая может быть выражена построением кривой доза-реакция. В научном мире понятия «гиперреактивность» и «гиперчувствительность» часто объединяют, используя термин «бронхиальная гиперреактивность», обобщающий всю совокупность механизмов бронхиального ответа.

Общепринятым золотым стандартом для оценки изменённой реактивности дыхательных путей служат фармакологические бронхопровокационные пробы, в частности, проба с метахолином и другими холинергическими аналогами, гистамином, метаболитами арахидоновой кислоты, которые при их ингаляции прямо воздействуют на гладкую мускулатуру бронхов. Несмотря на то, что данные пробы являются высокочувствительными и высоковоспроизводимыми в верификации синдрома, существует несколько отрицательных моментов в их применении, в том числе, связанных с дозированием и распределением вещества в дыхательных путях (Guidelines for methacholine..., 1999; K. Sumino et al., 2014).

Как правило, острая обструкция дыхательных путей сопровождается не только чрезмерным сокращением гладкой мускулатуры

бронхов, но и в большинстве случаев воспалительными изменениями в стенке трахеобронхиального дерева, включающими гиперемию, плазматический экссудат, отёк и гиперсекрецию. Последние сами по себе редко приводят к сильному сужению дыхательных путей, но в комбинации с констрикцией гладкой мускулатуры усиливают obstructивную реакцию бронхов.

В этой связи безусловный интерес для исследователей представляет категория непрямых бронхиальных стимулов, которые способны опосредованно изменять реактивность дыхательных путей через один или несколько механизмов, включая выброс эндогенных медиаторов и/или рефлекторную реакцию с участием центральных либо периферических проводящих нервных путей. Непрямые бронхиальные стимулы – такие как холодный воздух, гипо- и гиперосмолярные растворы, физическая нагрузка, изокапническая гипервентиляция, маннитол, аденозина монофосфат, брадикинин и другие химические агенты – позволяют конкретизировать не только влияние того или иного фактора, но и связать с происходящими воспалительными изменениями, лучше осуществлять терапевтический контроль.

Среди существующих экзогенных раздражителей, определяющих специфичность формирования и особенности клинических проявлений гиперреактивности дыхательных путей, наиболее универсальными являются факторы, которые в клиническом эксперименте способны модулировать реакцию, встречающуюся в повседневной жизни человека. Исключительно важным экологическим показателем среды является относительная влажность воздуха.

Очевидно, что сезонные тепло-влажностные колебания окружающего воздуха оказывают существенное воздействие на дыхательную систему человека, особенно у высокочувствительных лиц. В некоторых клинических работах отмечается устойчивая тенденция к ухудшению состояния и увеличению частоты госпитализаций больных с хроническими заболеваниями органов дыхания с наступлением холодной и/или влажной погоды. С этой точки зрения, наиболее проблемными являются регионы с муссонным или резко континенталь-

ным с периодами муссонов климатом, в связи с тем, что высокая либо низкая относительная и абсолютная влажность атмосферного воздуха, особенно в сочетании с низкими температурами, неблагоприятно влияют на течение респираторной патологии (Ю.М. Перельман, Н.С. Прилипко, 1998; Ю.М. Перельман, 2001, 2005; Ю.Ю. Хижняк и др., 2009; М.М. Миррахимов и др., 2011; А.Г. Приходько и др., 2011). Особенно это касается тех людей, чья профессиональная деятельность связана не только с длительным воздействием температуры и влажности, но и выполнением при этом тяжёлых физических нагрузок, поскольку сочетание этих трёх факторов может являться пусковым механизмом бронхоспазма и играть решающую роль в прогрессировании хронического воспаления у больных с заболеваниями органов дыхания.

В основе бронхоспастической реакции на осмотические триггеры лежат нарушения в клеточно-рецепторном комплексе за счёт происходящих изменений осмотического давления в плёнке поверхностной слизи, нарушений локального ионного гомеостаза, высвобождения эндогенных медиаторов, которые приводят к сокращению гладкой мускулатуры и отеку дыхательных путей.

Методика выявления гиперреактивности дыхательных путей на основе оценки реакции к различным осмотическим стимулам отличается большей физиологичностью проводимых исследований по сравнению с фармакологическими пробами, а также относительной безопасностью. При этом результат не зависит от подбора дозировки, распределения и задержки веществ в дыхательных путях. Данные пробы высокоэффективны и с точки зрения раннего выявления измененной реактивности дыхательных путей на естественный раздражитель. Кроме того, они в меньшей степени связаны с анатомо-физиологическими проблемами, существующими при использовании фармакологических стимулов, в частности, локализацией рецепторов, на которые воздействуют триггеры (С. Kotaru et al., 2005). Так, например, большинство холинергических рецепторов, с которыми ассоциирован механизм действия метахолина, располагаются в перифе-

рических дыхательных путях, что, безусловно, сказывается на структуре получаемой реакции у больных хроническими болезнями органов дыхания, приводя к диспропорции и нарушениям в фармакологическом сцеплении.

С нашей точки зрения, в диагностическом плане представляется достаточно важным для выявления и оценки патологической реакции дыхательных путей на осмотические стимулы использовать поэтапное обследование больных, которое заключается в предварительном сборе информации по выявлению экзогенных факторов, приводящих к ухудшению состояния (изменение погодных условий, физическая нагрузка и т.д.), с последующей объективизацией данных при выполнении бронхопровокационных тестов. Целенаправленное анамнестическое тестирование (анкетирование) перед проведением бронхопровокационных проб предназначено для предварительной постановки клинического диагноза с последующим отбором больных для проведения инструментального исследования. Такой анкетный опрос важен и при оценке динамики заболевания, контроля над ним и коррекции медикаментозной терапии.

Используемая нами анкета создавалась на основе практического опыта и анализа мировой литературы по изучению бронхиальной реактивности. Основная цель заключалась в обобщении данных и выделении основных клинических признаков, характеризующих осмотическую гиперреактивность дыхательных путей. Респондентами совместно с исследователем по предварительно составленным вопросам заполнялась анкета, включающая ответы на вопросы о проявлении клинических симптомов заболевания в повседневной жизни больного, характере появления жалоб после проведения острых бронхопровокационных проб, направленных на выявление осмотической гиперреактивности дыхательных путей, об аллергической настроенности организма, профессиональной деятельности и образе жизни пациента. Все ответы принимались во внимание, подсчитывалось количество баллов. По анкетным данным были построены таблицы, позволяющие исследовать совокупность признаков и значимость каждого индиви-

дуального признака, характеризующего осмотическую реактивность дыхательных путей, и соотнести его с наличием или отсутствием реакции. Ниже представлена скрининг-анкета с основными вопросами.

СКРИНИНГ-АНКЕТА ПО ВЫЯВЛЕНИЮ КЛИНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА ОСМОТИЧЕСКИЕ СТИМУЛЫ

1) Как часто в летний период (июнь-август), особенно при увеличении влажности воздуха (дождь, туман) Вы испытывали следующие симптомы:

Оцените симптомы по шкале от 1 до 7 баллов и обведите соответствующую цифру в ТАБЛИЦЕ:

1 – Ни разу

2 – Редко

3 – Непродолжительное время

4 – Меньшую часть времени

5 – Большую часть времени

6 – Почти все время

7 – Все время

Симптомы	Баллы						
Затруднённое дыхание (трудно сделать вдох или выдох)	1	2	3	4	5	6	7
Усиление одышки (учащённое дыхание) при выполнении обычной повседневной нагрузки на улице	1	2	3	4	5	6	7
Усиление или появление кашля (сухой, с мокротой, приступообразный)	1	2	3	4	5	6	7
Появление боли, дискомфорта, скованности в грудной клетке (за грудиной)	1	2	3	4	5	6	7
Появление заложенности носа	1	2	3	4	5	6	7
Появление слизистых выделений из носа	1	2	3	4	5	6	7
Появление першения в горле	1	2	3	4	5	6	7
Появление осиплости голоса	1	2	3	4	5	6	7
Увеличение количества доз используемого бронхолитика	1	2	3	4	5	6	7
Сколько лет беспокоят данные симптомы?							

2) Как часто в зимнее время года Вы испытываете следующие симптомы (оцените симптомы по шкале от 1 до 7 баллов и обведите соответствующую цифру в ТАБЛИЦЕ):

1 – Ни разу

2 – Редко

3 – Непродолжительное время

4 – Меньшую часть времени

5 – Большую часть времени

6 – Почти все время

7 – Все время

Симптомы	Баллы						
	1	2	3	4	5	6	7
Затруднённое дыхание (трудно сделать вдох или выдох)	1	2	3	4	5	6	7
Усиление одышки (учащённое дыхание) при выполнении обычной повседневной нагрузки на улице	1	2	3	4	5	6	7
Усиление или появление кашля (сухой, с мокротой, приступообразный)	1	2	3	4	5	6	7
Появление боли, дискомфорта, скованности в грудной клетке (за грудиной)	1	2	3	4	5	6	7
Появление заложенности носа	1	2	3	4	5	6	7
Появление слизистых выделений из носа	1	2	3	4	5	6	7
Увеличение количества доз используемого бронхолитика	1	2	3	4	5	6	7
Сколько лет беспокоят данные симптомы?							

3) Используете ли Вы дома увлажнитель воздуха в зимний период:

1. ДА 2. НЕТ

4) Испытываете ли вы симптомы со стороны дыхательных путей (затруднённое дыхание, кашель, заложенность носа, слизистое отделяемое из носа, дискомфорт в грудной клетке) при следующих обстоятельствах:

А. В домашних условиях при повышенной влажности окружающего воздуха

Б. Во время отдыха на море

В. При нахождении в помещении, где используется увлажнитель воздуха

Г. При нахождении в помещении, где работает кондиционер

Д. Пребывание или проживание в доме с влажными стенами, сырими подвалами (возможно после наводнения)

Е. Во время приёма горячей ванны или душа

Ж. Во время посещения бассейна, русской бани

З. Во время посещения сауны

И. При проведении паровых лечебных или косметических ингаляций

5) В какой период отмечаете наибольшее ухудшение симптомов со стороны дыхательной системы (затрудненное дыхание, усиление одышки, появление кашля, заложенности носа, слизистого отделяемого из носа, дискомфорта в грудной клетке, частое использование бронхолитика):

1. Июль-август

2. Сентябрь-октябрь, апрель-май

3. Ноябрь-март

6) При выполнении любой физической нагрузки как часто Вы испытываете следующие симптомы (оцените симптомы по шкале от 1 до 7 баллов и обведите соответствующую цифру в ТАБЛИЦЕ):

1 – Ни разу

2 – Редко

3 – Непродолжительное время

4 – Меньшую часть времени

5 – Большую часть времени

6 – Почти все время

7 – Все время

Симптомы	Баллы						
	1	2	3	4	5	6	7
Затрудненное дыхание (трудно сделать вдох или выдох)	1	2	3	4	5	6	7
Усиление одышки (учащенное дыхание) при выполнении обычной повседневной нагрузки на улице	1	2	3	4	5	6	7
Усиление или появление кашля (сухой, с мокротой, приступообразный)	1	2	3	4	5	6	7
Появление боли, дискомфорта, скованности в грудной клетке (за грудиной)	1	2	3	4	5	6	7
Увеличение количества доз используемого бронхолитика	1	2	3	4	5	6	7

7) При какой физической нагрузке вы испытываете симптомы со стороны дыхательной системы (затруднённое дыхание, усиление одышки, приступ удушья, появление кашля, используете бронхолитик):

1. Незначительная физическая нагрузка
2. Лёгкая
3. Умеренной интенсивности
4. Интенсивная
5. Очень интенсивная

8) Оцените степень своей одышки: выбрать один пункт

Шкала одышки mMRC (Modified Medical Research Council)

Степень	Описание
0 нет	одышка не беспокоит, за исключением очень интенсивной нагрузки
1 лёгкая	одышка беспокоит при быстрой ходьбе или подъеме на небольшое возвышение
2 средне-тяжелая	одышка приводит к более медленной ходьбе по сравнению с другими людьми того же возраста, или появляется необходимость делать остановки при ходьбе в обычном темпе по ровной поверхности
3 тяжелая	одышка заставляет делать остановки при ходьбе на расстояние около 100 м или через несколько минут ходьбы по ровной поверхности
4 очень тяжелая	одышка делает невозможным выход из дома или появляется при одевании и раздевании

На рис. 1 представлены графики и уравнения регрессионной зависимости между количеством баллов, полученных при анкетировании пациентов на предмет выявления клинической реакции на холод (А) и физическую нагрузку (Б), и реакцией дыхательных путей в ответ на бронхопровокационную пробу с ингаляцией дистиллированной воды (максимальное падение ОФВ₁ после пробы в процентах от исходной величины).

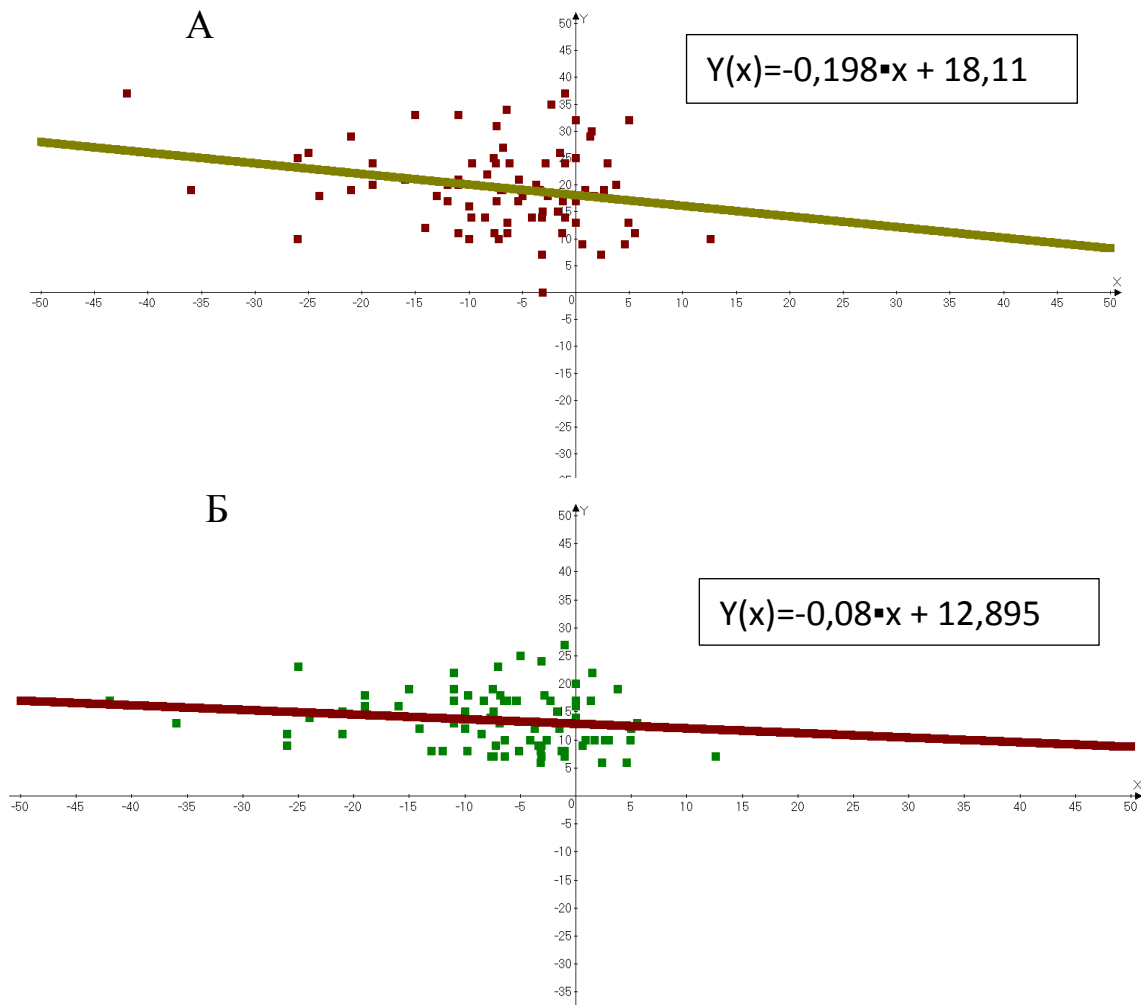


Рис. 1. Зависимость между реакцией дыхательных путей ($\Delta\text{ОФВ}_1$) на ингаляцию дистиллированной воды (ось X) и количеством баллов (ось Y), набранных пациентами при анкетировании по выявлению клинической реакции на холод (А) и физическую нагрузку (Б).

Инструментальное исследование осмотической реактивности дыхательных путей

Методика проведения аэрозольных бронхопровокационных проб

1. Для оценки реакции дыхательных путей на гипоосмотический стимул наиболее простым и доступным методом служит проба с ингаляцией аэрозоля дистиллированной воды (ИДВ). Для генерации аэрозоля используют ультразвуковой ингалятор (например, «Томех

L2», Польша), работающий на полной мощности, средний диаметр частиц распыляемого аэрозоля – 3 мкм (диапазон диаметров частиц 0,5÷10 мкм), производительность 0÷4,5 см³/мин, производительность надува 20 дм³/мин, при стабилизированной температуре 37°C (310±4К), рабочая ёмкость сосуда для раствора – 30 см³.

Исследование включает две последовательные ингаляции длительностью 3 минуты каждая. Ингаляции проводятся при произвольном спокойном дыхании обследуемого в положении сидя. Пациент дышит через загубник, присоединённый при помощи 2-ходового клапана к сосуду с ингалируемым раствором. Носовое дыхание исключается путём наложения носового зажима. Для первой ингаляции используют стерильный изотонический (0,9%) раствор натрия хлорида, при второй – аэрозоль дистиллированной воды. Объем, температура и уровень рН ингалируемых растворов стандартизованы для всех исследований. Общая доза аэрозоля, доставляемая пациенту, измеряется путём взвешивания чаши и трубки, исключая клапан, до и после провокации.

Вентиляционная функция легких оценивается путем спирометрии по данным кривой «поток-объем» форсированного выдоха (ПОФВ), рассчитывается разница между абсолютными значениями показателей до и после провокации в процентах от исходной величины (Δ , %). Контрольные исследования выполняются перед началом провокации, после ингаляции 0,9% раствора натрия хлорида, на 1 и 5-й минутах восстановительного периода после ингаляции дистиллированной воды.

2. С целью определения реакции дыхательных путей на гиперосмолярный стимул выполняется бронхопровокационная проба с ингаляцией гипертонического (4,5%) раствора (ИГР) хлорида натрия [14]. Исследование включает две последовательные ингаляции длительностью 3 минуты каждая. Для первой ингаляции используют 30 мл стерильного изотонического (0,9%) раствора NaCl, при второй - такое же количество 4,5% раствора NaCl. Параметры вентиляционной функции лёгких регистрируются при спирометрическом исследовании перед началом бронхопровокации, после ингаляции 0,9% раствора NaCl, а

также на 1 и 5 минутах восстановительного периода после ингаляции 4,5% раствора NaCl. Рассчитывается разница между их абсолютными значениями до и после провокации в процентах от исходной величины (Δ , %).

Критерии оценки аэрозольных бронхопровокационных проб

В клинической практике важно не только установить факт появления патологической реакции со стороны бронхиального дерева, но и определить степень ее выраженности для назначения адекватной терапии, динамического наблюдения за протекающим процессом. Большинство исследователей анализирует бронхоконстрикторную реакцию только по динамике $ОФВ_1$, считая его интегральным показателем, что не всегда оправдано. В качестве границ нормы нами взяты диапазоны изменений показателей $ОФВ_1$, ФЖЕЛ, $МОС_{50}$, $СОС_{25-75}$ после пробы ИДВ и ИГР у здоровых людей, верхний предел которых расширен до границ воспроизводимости (А.Г. Приходько, 2005). На основе полученных данных выделены границы нормы и градации отклонения от неё, благодаря чему клиницисты получили возможность не только верифицировать изменённую реактивность дыхательных путей, но и определить степень ее тяжести как один из дополнительных критериев оценки контроля над заболеванием.

В основу критериев степенной оценки гиперреактивности дыхательных путей положен расчёт количественных значений изменений параметров ПОФВ, полученных в результате пробы и представляющих собой верхние границы доверительных интервалов для средних величин у здоровых лиц. За диапазон нормы приняты изменения основных показателей ПОФВ, находящиеся в пределах $M+1,64\sigma$, где M – среднее значение показателя, полученное после пробы, σ – его среднее квадратичное отклонение. Отклонение любого из параметров на величину, превышающую установленную границу, следует считать патологическим, при этом статистически значимое изолированное изменение показателей $МОС_{50}$ и $МОС_{75}$ также может свидетельствовать о бронхоспазме на уровне дистальных дыхательных путей (табл. 1, 2).

Таблица 1. Границы нормы и степень отклонения от нормы параметров ПОФВ после ингаляции дистиллированной воды (% от исходных значений)

Показатель	Изменения			
	отсутствуют	умеренные	значительные	резкие
Через 1 мин. после провокации				
ДФЖЕЛ	менее 5	5-9	9-15	15 и более
ΔОФВ ₁	« 6	6-11	11-16	16 «
ΔОФВ ₁ /ФЖЕЛ	« 6	6-10	10-15	15 «
ΔПОС	« 16	16-26	26-42	42 «
ΔМОС ₅₀	« 16	16-27	27-42	42 «
ΔМОС ₇₅	« 26	27-43	43-68	68 «
ΔМОС ₂₅₋₇₅	« 15	15-25	25-40	40 «
Через 5 мин. после провокации				
ДФЖЕЛ	менее 5	5-10	19-16	16 «
ΔОФВ ₁	« 8	8-15	15-24	24 «
ΔОФВ ₁ /ФЖЕЛ	« 8	8-13	13-21	21 «
ΔПОС	« 19	19-30	30-48	48 «
ΔМОС ₅₀	« 26	26-46	46-76	76 «
ΔМОС ₇₅	« 35	35-62	62-101	101 «
ΔМОС ₂₅₋₇₅	« 24	24-44	44-73	73 «

Таблица 2. Границы нормы и степень отклонения от нормы параметров ПОФВ после ингаляции 4,5% раствора NaCl (% от исходных значений)

Показатель	Изменения			
	отсутствуют	умеренные	значительные	резкие
ДФЖЕЛ	менее 6	6-10	11-20	20 и более
ΔОФВ ₁	« 6	6-10	11-16	16 «
ΔОФВ ₁ /ФЖЕЛ	« 6	6-10	10-15	15 «
ΔПОС	« 11	12-20	21-31	31 «
ΔМОС ₅₀	« 17	18-26	27-41	41 «
ΔМОС ₇₅	« 30	31-49	50-76	76 «
ΔМОС ₂₅₋₇₅	« 16	17-26	27-40	40 «

Для создания шкалы степенной оценки измененной реактивности дыхательных путей использовано среднее статистическое отклонение (σ) в интервале $1,65\sigma-5\sigma$: распределение в интервале $1,65\sigma-3\sigma$ от среднего значения отнесено к умеренной степени гиперреактивно-

сти дыхательных путей, 3σ - 5σ – к значительной, свыше 5σ – к резкой степени нарушений. Проба считается положительной при отклонении параметров за установленные пределы.

Проба с дозированной физической нагрузкой

Для создания условий физиологического гиперосмолярного состояния дыхательных путей выполняется дозированная физическая нагрузка, задаваемая при помощи велоэргометра или тредмила. Частота сердечных сокращений и сатурация кислорода непрерывно отслеживаются во время тестирования при помощи пульсоксиметра. Уровень нагрузки подбирается индивидуально для каждого пациента учетом пола и антропометрических данных.

Исследование проводится в комфортных для пациента условиях при температурном режиме 18 - 25°C и относительной влажности окружающего воздуха 40 - 45% . Дыхание носом исключается путём наложения носового зажима. Продолжительность физической нагрузки составляет 8 минут: начальный темп ходьбы – $2,5$ км/час в течение 1 минуты, в течение последующих 3 минут мощность нагрузки наращивается ежеминутно до достижения субмаксимального значения ЧСС; последующие 4 минуты пациент выполняет нагрузку при субмаксимальной ЧСС и уровне МВЛ 60% макс. Субмаксимальная ЧСС рассчитывается как 75% от максимальной ЧСС = $220 - \text{возраст пациента в годах}$.

Реакция дыхательной системы на дозированную физическую нагрузку оценивается по данным кривой "поток-объем" форсированного выдоха. Контрольные исследования выполняются перед началом провокации и после неё на 1-й и 10-й минутах восстановительного периода. Рассчитывается разница между абсолютными значениями ОФВ_1 до и после проведения пробы в процентах от исходной величины ($\Delta\text{нОФВ}_1, \%$). В соответствии с международными рекомендациями гиперреактивность дыхательных путей на физическую нагрузку диагностируют при падении ОФВ_1 на 10% и более от исходного значения (Guidelines..., 1999; ATS/ACCP statement..., 2003).

Проба изокапнической гипервентиляции холодным воздухом

Для изучения гиперосмолярного состояния дыхательных путей в режиме экстремальной термической нагрузки выполняется проба изокапнической гипервентиляции холодным воздухом (ИГХВ), при которой соблюдено условие низкого содержания паров воды вентилируемого воздуха. Для усиления охлаждающего и высушивающего эффекта поступающего воздуха, дыхание во время проведения пробы осуществляется путём гипервентиляции в течение 3 минут охлаждённой до -20°C воздушной смесью, содержащей 5% CO_2 . Предлагаемые временные и температурные режимы достаточны для получения адекватного ответа на холодовую бронхопровокацию.

Для приготовления охлажденной воздушной смеси используется генератор холодного воздуха, включённый в работу автоматизированного аппаратно-программного комплекса, имеющего возможность снятия температурных параметров вдыхаемого и выдыхаемого воздуха, измерения параметров вентилируемой воздушной смеси, сравнения полученных результатов посредством программного обеспечения в режиме on-line (Ю.М. Перельман и др., 2012). Принцип работы аппарата заключается в следующем. В 150-литровом мешке готовится воздушная смесь с повышенной концентрацией CO_2 (5%). Воздух, обогащенный CO_2 , поступает из мешка в теплообменник, где происходит его охлаждение до -20°C и частичное высушивание за счет осаждения влаги на стенках кондиционера. PCO_2 воздушной смеси поддерживается на изокапническом уровне во избежание бронхоконстрикторного влияния гипокапнии. В потоке воздуха у рта располагается температурный датчик, позволяющий непрерывно отслеживать температуру воздуха при дыхании. Уровень вентилиации при проведении пробы соответствует 60% должной максимальной вентилиации легких (МВЛ), рассчитываемой по формуле:

$$\text{должная МВЛ} = \text{должная ОФВ}_1 \times 35.$$

Частота и глубина дыхания подбираются индивидуально каждому пациенту. Частота дыхания задается с помощью метронома, а

глубина (дыхательный объем) – на экране осциллоскопа, соединенного с пневмотахографом. При этом обследуемый располагается таким образом, чтобы самостоятельно визуально по амплитуде спирограммы (интегрированной пневмотахограммы) на экране осциллоскопа контролировать глубину дыхания с одновременно навязываемой частотой (Ю.М. Перельман, А.Г. Приходько, 2002; Ю.М. Перельман и др., 2012).

Основным критерием оценки служит падение ОФВ₁ после провокации более чем на 10% от исходного уровня (А.Г. Приходько, Ю.М. Перельман, 1999). За диапазон нормы принято изменение показателя, находящиеся в пределах $M+1,64\sigma$, (где M – среднее значение показателя, полученное после пробы, σ – его среднее квадратичное отклонение) у здоровых людей, без семейного анамнеза бронхиальной астмы, атопии и недавних респираторных инфекций. Обычно проводят измерение ОФВ₁ через 1, 5 и 30 минут после прекращения ингаляции холодного воздуха, но возможны и более длительные измерения, если ожидается отсроченная реакция. Рассчитывается разница абсолютных значений ОФВ₁ до и после пробы по отношению к исходной величине в процентах. Выраженность изменений ОФВ₁ в ответ на пробу ИГХВ отражает степень тяжести холодовой гиперреактивности дыхательных путей: легкую, среднетяжелую и тяжелую (табл. 3). В основу классификации положены значения показателя до применения медикаментозной терапии.

Таблица 3. Классификация степени тяжести холодовой гиперреактивности дыхательных путей по реакции на пробу ИГХВ (Δ ОФВ₁, %).

Степень тяжести	1 мин	5 мин	30 мин
Легкая	10-19	15-24	10-19
Средней тяжести	20-29	25-39	20-30
Тяжелая	Более 30	Более 40	Более 30

Следует отметить, что проведение бронхопровокационных проб может быть ограничено вследствие ряда объективных причин: выра-

женных нарушений вентиляционной функции лёгких по обструктивному типу с уменьшением $ОФВ_1$ ниже 70% должной величины, $ОФВ_1/ЖЕЛ$ – ниже 60% должной величины; наличия выраженной аллергической реакции, холодовой аллергии, преклонного возраста, сопутствующей патологии. Кроме того, у пациентов с нарушенной вентиляционной функцией легких по обструктивному типу любые бронхопровокационные пробы имеют невысокую специфичность, поскольку исходная бронхиальная обструкция может нивелировать реакцию на стимул и, следовательно, можно получить заведомо ложноотрицательный результат. В этом случае необходимо назначить адекватную терапию с целью восстановления бронхиальной проходимости к лучшим значениям для пациента, после чего провести бронхопровокационную пробу.

Глава 2. КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

2.1. Особенности реакции дыхательных путей на ингаляцию дистиллированной воды у больных хроническими обструктивными болезнями органов дыхания

Оценивая воздействие лишь одного из множества экзогенных факторов на органы дыхания человека, мы невольно вычленим его из сложного комплекса сопряженных с ним и усиливающих его влияние триггеров. Важными экологическими показателями среды являются относительная и абсолютная влажность атмосферного воздуха и его температура. В условиях муссонного климата Дальневосточного региона неблагоприятное сочетание высокой влажности и низких температур оказывает существенное влияние на резистентность дыхательной системы (Ю.Ю. Хижняк и соавт., 2009). Так, ранее нами была обнаружена прямая линейная зависимость градиента температур выдыхаемого через нос воздуха с носовым сопротивлением потоку ($r=0,54$, $p<0,05$), а также физическими характеристиками вдыхаемого воздуха: температурой ($r=0,69$, $p<0,05$) и относительной влажностью ($r=0,60$, $p<0,05$) (А.Г. Приходько и др., 2011). В работе Н.С. Прилипко, Ю.М. Перельмана (1991) у больных хроническим бронхитом установлен чёткий монофазный ритм бронхиальной проходимости и воздухонаполненности лёгких в течение года в зависимости от среднемесячных температур окружающего воздуха и атмосферного давления, бифазный – реактивности дыхательных путей, совпадающий с аналогичным ритмом скорости ветра и относительной влажности воздуха.

Поскольку реакция на гипоосмолярный стимул идентична воздействию влажного воздуха на дыхательные пути, выявление феномена осмотической гиперреактивности бронхов имеет важное значе-

ние для больных, страдающих хроническими болезнями органов дыхания. Выполненные нами в этом направлении исследования по изучению влияния на дыхание острой бронхопровокационной пробы с аэрозолем дистиллированной воды свидетельствуют о существовании у части здоровых лиц и больных хроническими обструктивными заболеваниями легких специфической реактивности дыхательных путей к осмотическому стимулу (А.Г. Приходько, 2005, 2006). Для того, чтобы оценить её клинические и функциональные особенности нами было обследовано 354 больных разными формами болезней органов дыхания.

Клинические проявления данной реакции у больных были слабо выражены, что предполагает вероятность бессимптомного течения бронхиальной гиперреактивности. В острой пробе, проведённой в условиях лаборатории, ингаляции дистиллированной воды в 24% случаев сопутствовал непродуктивный кашель, в меньшей степени – першение в горле, боль за грудиной, однако не у всех пациентов это сопровождалось бронхоспастической реакцией по данным спирографического исследования. И наоборот, определена группа больных (42%), хорошо перенёвших исследование, но с развившимся бронхоспазмом в ответ на ингаляцию гипоосмолярного раствора.

По результатам инструментального исследования после бронхопровокации аэрозолем дистиллированной воды изменённая реактивность встречалась более чем у 58% больных бронхиальной астмой и 53% больных хроническим бронхитом и ХОБЛ, не получавших ранее базисной медикаментозной терапии. Степень её выраженности в разных группах существенно различалась. Как правило, в группе больных бронхиальной астмой изменения параметров бронхиальной проходимости в ответ на ИДВ носили однонаправленный характер, с падением показателей на первой минуте после провокации и равномерным их снижением на всех уровнях бронхиального дерева (табл. 4).

Минимальные изменения значений на пятой минуте восстановительного периода у астматиков связаны с тем, что состояние большинства больных требовало неотложного вмешательства с примене-

нием бронхолитической терапии по окончании провокации, в дальнейших измерениях такие пациенты не принимали участия.

Таблица 4. Изменения параметров ПОВФ у больных бронхиальной астмой после ингаляции изотонического раствора и дистиллированной воды (% от исходных значений).

Показатель	Вид ингаляции		
	0,9% раствор NaCl	дистиллированная вода	
		1 мин.	5 мин.
Δ ФЖЕЛ	-2,24±0,79**	-7,75±1,88*** p<0,01; p ₁ <0,001	-2,02±0,92* p ₃ <0,001
Δ ОВВ ₁	-2,64±0,91** p ₂ <0,05	-12,35±2,34*** p<0,01; p ₁ <0,001; p ₂ <0,05	-3,64±1,15** p<0,05; p ₃ <0,001
Δ ОВВ ₁ /ЖЕЛ	-0,46±0,63	-5,39±1,17*** p<0,05; p ₁ <0,01; p ₂ <0,05	-1,70±0,72* p ₃ <0,001
Δ ПОС	-2,87±1,10*	-11,07±2,46*** p<0,05; p ₁ <0,001	-4,08±1,31** p ₃ <0,001
Δ МОС ₅₀	-1,97±2,46	-19,80±4,14*** p<0,01; p ₁ <0,001	-6,89±2,70** p ₂ <0,05; p ₃ <0,001
Δ МОС ₇₅	-0,21±3,36	-15,87±3,32*** p<0,05; p ₃ <0,05	-7,90±2,46** p ₃ <0,01
Δ МОС ₂₅₋₇₅	-1,85±2,07	-19,57±3,72*** p<0,01; p ₁ <0,001; p ₂ <0,05	-6,89±2,24 p ₂ <0,05; p ₃ <0,001

Примечание: Здесь и далее p – достоверность различий в сравнении с группой здоровых; p₁ – с больными хроническим необструктивным бронхитом; p₂ – с больными ХОБЛ. Звёздочкой отмечено статистически достоверное падение показателя после провокации (парный критерий t) * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; p₃ – достоверность различий в сравнении с пробой ИГХВ.

У больных хроническим необструктивным бронхитом и ХОБЛ мы не нашли столь выраженной динамики, как у больных бронхиальной астмой. Уровень снижения показателей бронхиальной проходимости в среднем по группе не достигал статистических различий между больными хроническим необструктивным бронхитом и здоровыми лицами за счёт большого разброса индивидуальных значений (табл. 5). В то же время отмечено их высокодостоверное падение по

сравнению с исходными данными после ингаляции изотонического раствора и через 5 минут после окончания исследования.

Таблица 5. Изменения параметров ПОФВ у больных хроническим необструктивным бронхитом после ингаляции изотонического раствора и дистиллированной воды (% от исходных значений).

Показатель	Вид ингаляции		
	0,9% раствор NaCl	дистиллированная вода	
		1 мин.	5 мин.
Δ ФЖЕЛ	-1,14±0,42*	-0,33±0,69	-0,85±0,53
Δ ОФВ ₁	-1,89±0,57**	-1,61±0,79; p ₃ <0,01	-2,01±0,72**
Δ ОФВ ₁ /ЖЕЛ	-0,76±0,53	-1,30±0,57*	-1,02±0,59
Δ ПОС	-3,07±1,17	-1,06±1,67	-3,08±1,39*
Δ МОС ₅₀	-1,48±2,06	-2,67±2,17	-1,95±1,96
Δ МОС ₇₅	-0,58±3,28	-6,22±3,30	-2,80±2,84 p ₃ <0,01
Δ МОС ₂₅₋₇₅	-1,31±1,83	-4,17±2,05*	-2,83±2,01 p ₃ <0,05

У больных ХОБЛ ингаляция изотонического раствора сопровождалась тенденцией к приросту показателей бронхиальной проходимости, в большей степени на уровне дистальных бронхов (табл. 6).

Таблица 6. Изменения параметров ПОФВ у больных ХОБЛ после ингаляции изотонического раствора и дистиллированной воды (% от исходных значений).

Показатель	Вид ингаляции		
	0,9% раствор NaCl	дистиллированная вода	
		1 мин.	5 мин.
Δ ФЖЕЛ	-0,13±0,89	-5,01±0,66*** p<0,05	1,40±0,95 p ₁ <0,01
Δ ОФВ ₁	0,13±0,93	-4,60±1,99*	-1,06±0,92
Δ ОФВ ₁ /ЖЕЛ	0,14±1,29	-0,70±1,47	-0,05±0,90
Δ ПОС	0,52±1,45 p<0,05	-6,03±2,40*	-3,24±1,79
Δ МОС ₅₀	3,75±6,24	-8,58±3,79*	3,21±3,20 p ₃ <0,05
Δ МОС ₇₅	5,75±6,02	-1,53±7,94	0,61±4,68
Δ МОС ₂₅₋₇₅	2,92±5,84	-4,96±4,56	1,02±3,05

Воздействие дистиллированной воды приводило к достоверному снижению скоростных параметров форсированного выдоха с максимальным падением их в первую минуту после прекращения пробы. К 5-й минуте отмечалось уменьшение отклонения $ОФВ_1$ и остальных параметров кривой поток-объем, свидетельствующее о восстановлении бронхиальной проходимости.

У больных хроническим необструктивным бронхитом (ХНБ) и ХОБЛ обнаружена тесная взаимосвязь осмотической и холодовой гиперреактивности дыхательных путей, проявлявшаяся корреляционной зависимостью степени падения $ОФВ_1$ в ответ на бронхопровокационные пробы с ИДВ и ИГХВ ($r=0,50$, $p<0,05$ и $r=0,57$, $p<0,01$, соответственно). У больных бронхиальной астмой подобной прямой взаимосвязи выявлено не было, однако найденное в определенном проценте случаев сочетание чрезмерной реакции бронхов на холодовой и осмотический триггеры (рис. 2) достоверно увеличивало степень падения $ОФВ_1$ в ответ на ИГХВ по сравнению с изолированной холодовой гиперреактивностью дыхательных путей ($-21,3\pm 1,96\%$ и $-14,5\pm 2,70\%$, соответственно, $p<0,05$).

Кроме того, у астматиков прослеживалась чёткая зависимость между клиническими признаками реагирования на холодовое воздействие, которое было обнаружено при ответах на вопросы о влиянии зимнего периода времени на состояние здоровья, и выраженностью реакции дыхательных путей ($\Delta ОФВ_1$) после бронхопровокации дистиллированной водой ($r=-0,32$, $p<0,01$).

Ниже представлено линейное уравнение, описывающее эту связь:

$$\Delta ОФВ_1 = -0,14 - 0,93 \times B,$$

где $\Delta ОФВ_1$ – реакция дыхательных путей в ответ на бронхопровокацию дистиллированной водой, B – количество баллов при ответе на вопросы анкеты о состоянии больного в зимнее время года. Регрессия значима с вероятностью 99,8%, объясняет 37% дисперсии.

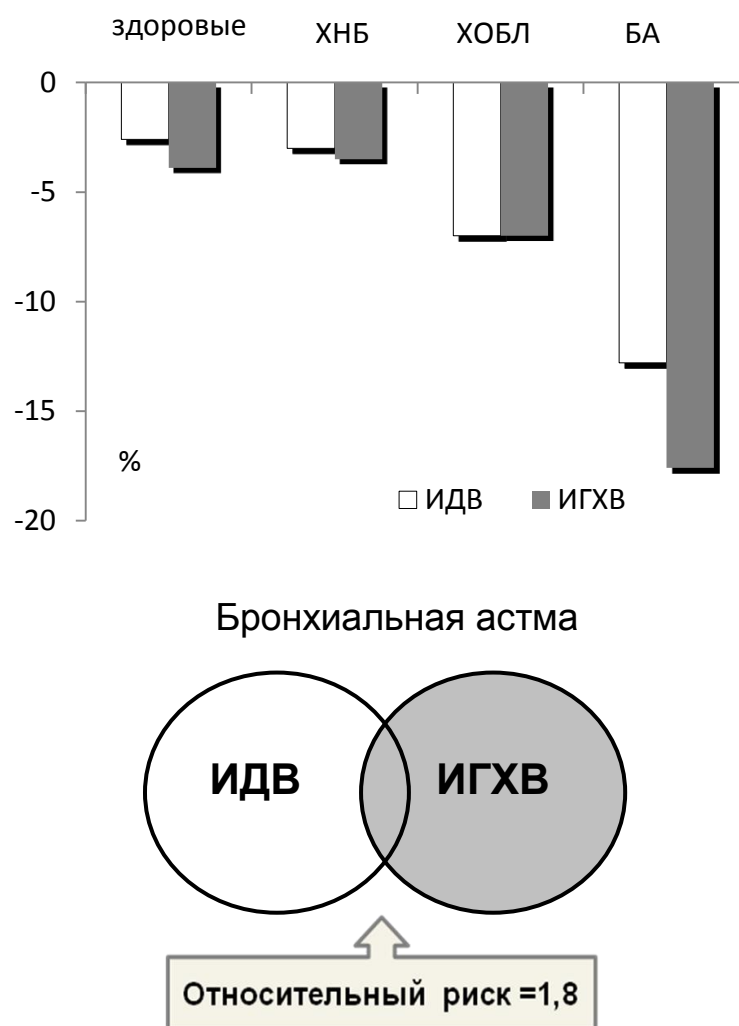


Рис. 2. Характер взаимоотношений между бронхопровокационными пробами при хронических болезнях органов дыхания.

В целом, характер найденных взаимосвязей у больных хроническими болезнями органов дыхания подтверждал фенотипические различия существующего персистирующего воспаления, нарушенной проницаемости капилляров и связанного с ними клеточного и интерстициального отёка. Получены интересные экспериментальные данные (Н. Mochizuki et al., 2002), свидетельствующие о том, что воспаление усиливает реакцию дыхательных путей, вызванную ингаляцией дистиллированной воды, подавление которой происходит при предварительном введении индометацина. В то же время у больных брон-

хиальной астмой такой взаимосвязи не наблюдалось (A. Chetta et al., 1996).

Как и в случае с гиперреактивностью бронхов после холодной бронхопровокации, возникшее в ходе пробы с ИДВ нарушение бронхиальной проходимости было хорошо обратимо: в ответ на ингаляцию бронходилататора прирост $ОФВ_1$ был достаточно высоким: у астматиков $\Delta ОФВ_1$ в среднем был равен $29,8 \pm 5,01\%$, у больных ХОБЛ – $26,4 \pm 7,05\%$. Это указывает на спазм гладкой мускулатуры как одну из основных причин сужения дыхательных путей. Кроме того, нами выделена группа больных (34%), у которых ингаляция дистиллированной воды, как и в пробе ИГХВ, вызывала бронхолитический эффект, что также свидетельствовало в пользу нейрогенных механизмов.

Исходя из вышеизложенного, следует говорить о существовании общих механизмов в патогенезе формирования реакции на гипоосмолярный стимул у больных бронхиальной астмой и хроническим бронхитом, возможно, связанных с нарушением в регуляции чувствительных окончаний афферентных нервов дыхательных путей. Воспаление, приводящее к длительным изменениям в функции нерва, часто называемым нейропластичностью, в состоянии нарушить экспрессию различных генов, вовлечённых в продукцию нейропептидов, нейромедиаторов и различных ионных каналов, несущих двойную ответственность за изменение температуры и осмотическую регуляцию реактивности дыхательных путей.

Существовало многообразие мнений относительно механизмов возникновения бронхоспазма, вызванного гипоосмолярным стимулом. Одно из распространённых суждений, что ингаляция дистиллированной воды приводит к быстрому изменению осмолярности и электролитного баланса (L.M. Fabbri et al., 1984). С точки зрения В.А. Букова, Р.А. Фельбербаума (1980), чрезмерная конденсация пара, который по сути является гипоосмолярным раствором, в области рефлексогенной зоны служит пусковым механизмом бронхоспазма. Предполагалось, что носовая полость ведёт себя как осмотический

датчик, передавая информацию со слизистой дыхательных путей (N.J. Willumsen et al., 1994). Конденсация избытка влаги на слизистой не только обладает раздражающим действием, но и может изменять поверхностное натяжение жидкости и через эти механизмы вызывать высвобождение биологически активных веществ (E.R. McFadden et al., 1986).

Оспаривалось непосредственное влияние гипоосмолярного раствора на клеточно-рецепторном уровне, прежде всего на тучные клетки и базофилы (C.M. Smith, S.D. Anderson, 1989). В результате воздействия на эти клетки происходит высвобождение гистамина и других медиаторов, которые прямым образом влияют на сокращение гладкой мускулатуры дыхательных путей. С другой стороны, инъекция воды в долевой бронх собаки стимулирует С-волокна дыхательных путей и быстро адаптирующиеся ирритантные рецепторы, вызывая рефлекторный бронхоспазм с увеличением бронхиального кровотока за счет активации неадренергических нехолинергических автономных проводящих путей (T.E. Pisarri et al., 1993). Имеются единичные сведения, что бронхоспазм может модулироваться реакцией бронхиальных сосудов (M.P. Zimmerman, T.E. Pisarri, 2000).

В эксперименте показано, что под действием гипоосмолярного стимула в эпителиальных клетках возникают отеки и увеличение клеточного давления (J.S. Fedan et al., 1999). Кроме того, было высказано предположение о нарушениях в самой гладкомышечной клетке. Наряду с её чрезмерным сокращением в ответ на гипоосмолярный стимул, увеличивается деполяризация мембраны клеток.

Отёчностью стенки дыхательных путей также объясняли результаты проведенных на добровольцах исследований R. Pellegrino et al. (2003), получившие более выраженную реакцию к метахолину после внутривенной инфузии физиологического раствора. Однако такая гипотеза могла только отчасти удовлетворить нас в объяснении возникновения бронхоспазма в ответ на гипотонический стимул, поскольку 7% больных в нашем исследовании имели реакцию к изотоническому раствору, значительно превышавшую пределы воспроиз-

водимости. Скорее, она была связана с высокой чувствительностью ирритантных рецепторов в ответ на механическое раздражение.

С другой стороны, у астматиков с выявленной гиперреактивностью дыхательных путей к осмотическому стимулу имелась высокая скорость восстановления параметров бронхиальной проходимости и существенный прирост на ингаляцию β_2 -агониста после пробы с дистиллированной водой, намного превышавший значения, полученные до провокации, что свидетельствовало против отека как главного механизма бронхоспастической реакции у больных бронхиальной астмой.

С этих позиций большой интерес представляют исследования, выполненные R.M. Effros et al. (2002), которые показали, что гипосмолярное состояние сопровождается увеличением секреции калия. Увеличенное содержание ионов калия в межклеточной среде повышает реактивность бронхов, стимулируя выделение нервными окончаниями блуждающего нерва ацетилхолина. Ингаляция дистиллированной воды снижает уровень оксида азота в выдыхаемом воздухе у больных бронхиальной астмой, однако бронхообструктивная реакция, развившаяся в ответ на стимул, только частично связана со степенью уменьшения NO (M. Maniscalco et al., 2002).

Неизвестно, связаны ли изменения в осмолярности с активностью осмочувствительных нейронов, либо происходят из-за механического набухания ткани с последующими изменениями в электрохимическом градиенте. Первичные афферентные нейроны, в отличие от нейронов центральной нервной системы, содержат относительно большие концентрации хлорида. Уменьшение внеклеточной концентрации хлорида, – например, изотонической декстрозой, – стимулирует афферентные нервы дыхательных путей, вероятнее всего, за счёт увеличения активности специфического NKCC1 ((Na⁺)-(K⁺)-(2Cl⁻) ко-транспортер), связанного с происходящими изменениями в градиенте. Протеиновая помпа перекачивает два аниона хлорида в клетку в обмен на катионы натрия и калия. Действительно, раздражение афферентного нерва, вызванное пониженным содержанием хлора, может

быть ингибировано фуросемидом (F.V. Sant'Ambrogio et al., 1993).

Наиболее вероятными прямыми участниками осмозависимой бронхоконстрикции следует в настоящее время считать подсемейство ваниллоидных рецепторов с транзиторным рецепторным потенциалом: TRPV1, TRPV2 и TRPV4 (D.E. Naumov et al., 2015). Эти TRP-каналы неселективно регулируют выделение катионов и способны к инициированию рецепторного потенциала. Эндогенными стимуляторами для TRPV1 служат интенсивное тепло, ацидоз, метаболиты арахидоновой кислоты (S.W. Hwang et al., 2000; M. Kollarik, B.J. Undem, 2004), усиливающие его свойства. В легких TRPV1 на вагусных приводящих С-волокнах может также быть активирован активными формами кислорода, но является ли это прямым эффектом или вторичным процессом в результате выброса других стимуляторов TRPV1, пока неизвестно. Ответственны ли TRP-каналы в осмотических бронхоконстрикторных реакциях, ещё предстоит исследовать, но предварительно введённые атропин и антагонисты нейрокиновых рецепторов 1, 2 типов уменьшают, а β_2 -агонисты полностью купируют реакцию дыхательных путей, вызванную гипервентиляцией горячим влажным воздухом (T. Ruan et al., 2005, T. Taylor-Clark, B.J. Undem, 2006; R.-L. Lin et al., 2009). Поскольку гомеостаз жидкости в организме реализуется выбросом аргинин-вазопрессина из нейрогипофиза, которым, в свою очередь, управляют определённые и очень чувствительные «осморепторы» в гипоталамусе, вполне допустимо, что ген *TRPV1* кодирован центральным компонентом, отвечающим за осморепрецию (R. Sharif Naeini et al., 2006).

2.2. Особенности течения бронхиальной астмы у больных с изолированной и сочетанной реакцией дыхательных путей на гипоосмотический и холодовой стимулы

Высокая относительная влажность окружающего воздуха в регионах со сложными климатическими либо экстремальными условиями, в том числе, связанными с частыми неблагоприятными явления-

ми природы (туман, муссонные дожди, наводнения, резкие суточные колебания температуры и т.д.), а также её сочетание с низкими температурами оказывает существенное влияние на организм человека (Ю.М. Перельман и др., 2008; М.М. Миррахимов и др., 2011; А.Г. Приходько и др., 2011).

Нами были исследованы особенности клинических проявлений реакции со стороны органов дыхания на такие экологические стимулы как влажность и низкая температура у больных бронхиальной астмой, уровень их взаимного влияния друг на друга и характер взаимосвязи между гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный и холодовой стимулы и нарушением вентиляционной функции легких. С этой целью мы обследовали 304 больных бронхиальной астмой (средний возраст $35,1 \pm 1,2$ лет), которые по характеру реагирования на триггеры в острой бронхопровокационной пробе с холодным воздухом и дистиллированной водой были объединены в следующие группы (рис. 3): в 1 группу включены лица с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой и влажностный стимул одновременно, 2 группа была представлена больными с гиперреактивностью бронхов только на ингаляцию дистиллированной воды, 3 группа – только с положительной реакцией на изокапническую гипервентиляцию холодным воздухом, 4 группа – с отсутствием реакции на оба триггера.

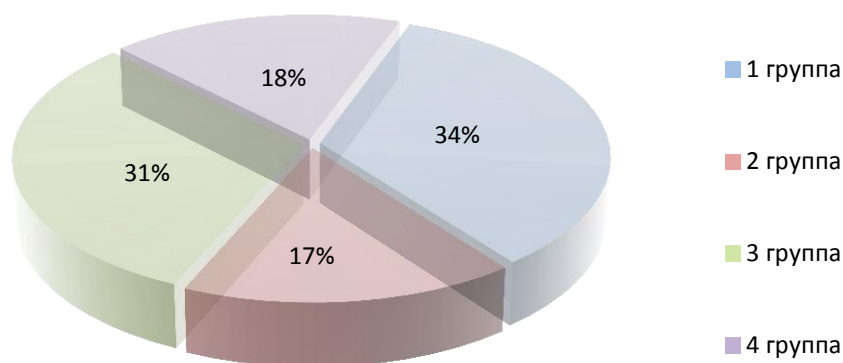


Рис. 3. Распределение больных по группам (% от общего числа больных).

Следует отметить, что больные, изолированно реагировавшие на ингаляцию дистиллированной воды либо холодный воздух, показали такой же высокий процент падения всех скоростных показателей вентилиционной функции лёгких после пробы, как и пациенты, имевшие сочетанную реакцию на оба триггера (табл. 7).

Таблица 7. Изменение параметров ПОФВ после бронхопровокации холодным воздухом и дистиллированной водой (в % от исходных значений).

Показатель	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
Проба изокапнической гипервентиляции холодным воздухом				
$\Delta\text{ОФВ}_1$ (%)	-20,9±1,69	-2,0±1,24***	-16,8±1,18*, $p_1 < 0,001$	-3,1±0,36*** $p < 0,001$
$\Delta\text{МОС}_{50}$ (%)	-24,7±4,19	-3,7±2,01***	-27,3±1,94 $p_1 < 0,001$	-3,0±1,14*** $p < 0,001$
$\Delta\text{МОС}_{25-75}$ (%)	-23,0±4,73	-2,9±2,24***	-26,8±1,97 $p_1 < 0,001$	-3,0±1,13*** $p < 0,001$
Бронхопровокационная проба с дистиллированной водой				
$\Delta\text{ОФВ}_1$ (%)	-20,0±2,37	-20,2±1,97	-2,7±0,77*** $p_1 < 0,001$	-1,5±0,50*** $p_1 < 0,001$
$\Delta\text{МОС}_{50}$ (%)	-26,5±3,39	-25,9±2,58	-2,0±1,78*** $p_1 < 0,001$	0,73±1,26*** $p_1 < 0,001$
$\Delta\text{МОС}_{25-75}$ (%)	-27,1±3,22	-25,8±3,21	-0,58±2,27*** $p_1 < 0,001$	0,93±1,53*** $p_1 < 0,001$

Примечание: Здесь и далее звёздочкой отмечена достоверность различий с 1 группой (* – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$); p – достоверность различий с 3 группой; p_1 – достоверность различий со 2 группой.

Мы обобщили информацию, полученную путём анкетного опроса, в группах и оценили субъективные ощущения больных в условиях холода и при высокой влажности окружающего воздуха (рис. 4). Прежде всего, обращает на себя внимание более высокий процент людей, испытывавших те или иные клинические симптомы при воздействии холода, в меньшем числе случаев астматики реагировали на высокую влажность. Представляется интересным тот факт, что пациенты с гиперреактивностью на гипоосмолярный стимул в равной степени отмечали ухудшение состояния при контакте как с холодным, так и с влажным воздухом ($\chi^2=0,32$; $p > 0,05$). У пациентов с изолиро-

ванной холодовой гиперреактивностью дыхательных путей, симптоматика на холод выявлялась практически в 2,5 раза чаще ($\chi^2=11,6$; $p<0,001$).

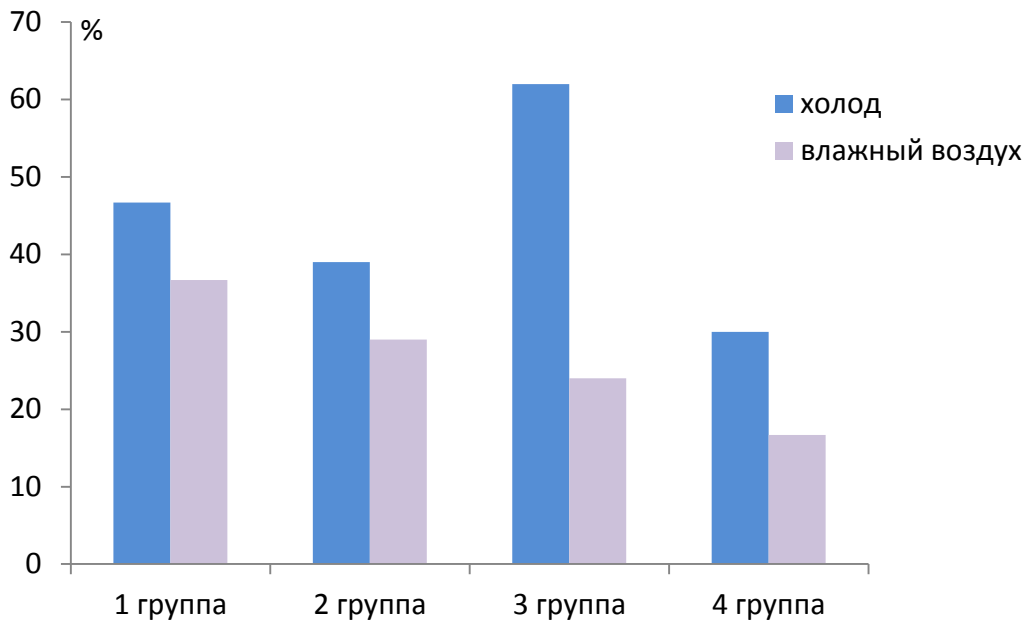


Рис. 4. Субъективные ощущения больных на холод и высокую влажность окружающего воздуха (% от числа больных в группе).

Для большинства из этих больных клинически значимыми жалобами на воздействие триггеров были скованность в грудной клетке, сопровождавшаяся затруднением дыхания, в некоторых случаях удушьем, менее специфичным признаком являлось появление различного по интенсивности кашля при контакте с холодным воздухом. В повседневной жизни симптомы, указанные пациентами, существенно не отличались от подробно описанных нами ранее (А.Г. Приходько и др., 2011).

Пациенты, реагирующие на оба стимула, имели наиболее развернутую картину заболевания с более длительным анамнезом (в среднем 5 лет) и выраженностью основных респираторных симптомов: ежедневными эпизодами затруднённого дыхания, более частыми ночными приступами, ощущением хрипов при дыхании, интенсивным кашлем, появлением одышки 1-2 ст. по шкале mMRC и низкой переносимостью физической нагрузки (рис. 5).

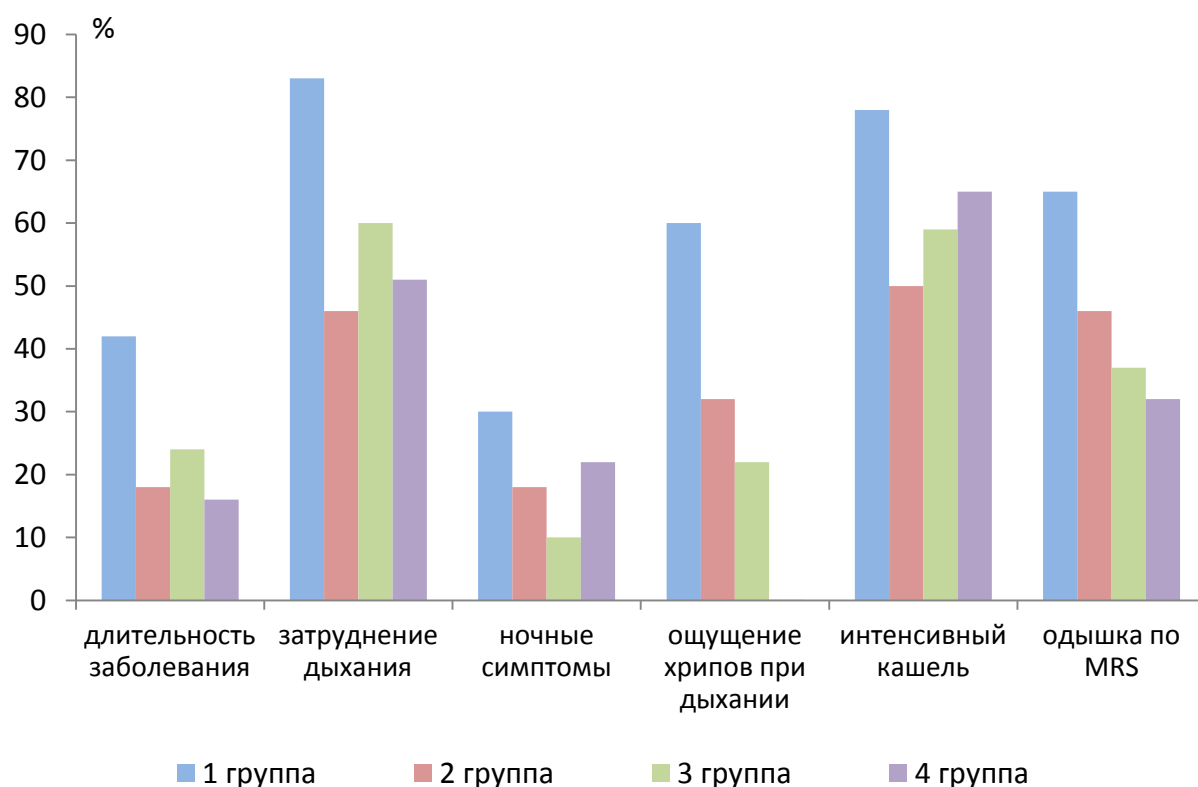


Рис. 5. Клиническая характеристика обследованных больных (частота встречаемости признака, в % от числа больных в группе).

На момент обследования значительная часть больных этой группы имела неконтролируемое (57%) и частично контролируемое течение (30%) болезни. Практически такая же картина наблюдалась и во второй группе (46 и 36%, соответственно), тогда как в 3 и 4 группах преобладали пациенты с контролируемым (31 и 36%, соответственно) и частично контролируемым (40 и 38%, соответственно) течением.

Аналогичная тенденция складывалась и при оценке исходных параметров вентиляционной функции лёгких (табл. 8). В отличие от остальных обследованных лиц, у пациентов 1 группы присутствовали генерализованные нарушения бронхиальной проходимости, характеризовавшиеся достоверным снижением всех скоростных показателей ($ОФВ_1$, $ОФВ_1/ЖЕЛ$, $МОС_{50}$, $МОС_{25-75}$) и, как следствие, их высоким приростом в реакции на β_2 -агонист.

Таблица 8. Параметры кривой «поток-объем» форсированного выдоха.

Показатель	1 группа	2 групп	3 группа	4 группа
ФЖЕЛ (%, долж.)	106,6±3,08	105,4±3,17	109,3±2,17	108,4±1,26
ОФВ ₁ (%, долж.)	84,2±2,96	92,2±2,48*	94,0±2,09*	98,6±1,30*** p<0,05
ОФВ ₁ /ЖЕЛ (% долж.)	79,5±2,14	89,0±1,61***	86,4±1,43**	92,5±0,82*** p<0,001
ПОС (%, долж.)	89,7±3,66	94,6±2,97	98,1±2,37*	105,9±2,01*** p<0,05 p ₁ <0,05
МОС ₅₀ (%, долж.)	51,3±3,41	67,4±3,35**	63,0±2,65**	75,2±2,19*** p<0,01
МОС ₂₅₋₇₅ (%, долж.)	50,0±4,91	67,7±3,34**	62,7±3,01*	71,0±2,71***
ΔОФВ ₁ (%) Б	17,3±4,42	12,2±2,50	12,4±1,67	7,3±0,74 p<0,01
ΔМОС ₅₀ (%) Б	33,4±9,87	45,4±15,78	29,7±3,81	21,7±1,80*** p<0,05 p ₁ <0,05

Примечание: Б – прирост показателя на введение β₂-агониста.

Наряду с высокой лабильностью бронхов, в данной группе прослеживались начальные признаки появления необратимого компонента обструкции, связанного со структурной перестройкой респираторного тракта вследствие хронического воспаления: постбронходилатационная величина ОФВ₁/ЖЕЛ для лиц 1 группы составляла в среднем 73,5±1,78% и была достоверно ниже, чем у больных 4 группы (80,4±0,71%, p<0,01). Во 2 группе отношение ОФВ₁/ЖЕЛ составляло в среднем 78,1±1,33%, в 3 группе 77,8±1,21% (p>0,05 в сравнении с 4 группой).

По данным корреляционного анализа, были обнаружены тесные взаимоотношения между реактивностью дыхательных путей и проходимость бронхов: исходная величина ОФВ₁ (в % от должного) существенно влияла на выраженность бронхоконстрикторной реакции (ΔОФВ₁, %), полученной при проведении бронхопровокационного теста с ингаляцией дистиллированной воды, причем эта зависимость

носила прямой линейный характер ($r=0,39$; $p<0,05$). При пробе ИГХВ данная корреляционная зависимость была обратной ($r=-0,44$; $p<0,05$). На общей совокупности больных прослеживалась связь между реакцией пациентов на стимулы и уровнем эозинофилии крови ($r=-0,16$ ÷ $-0,27$; $p<0,05$ ÷ $0,001$).

Как известно, прогноз течения бронхиальной астмы во многом определяется генотипическими и фенотипическими особенностями развития болезни, определяющими достижение и поддержание фармакотерапевтического контроля и качество жизни пациентов (Н.Л. Перельман, 2010, 2016). По целому ряду причин длительное поддержание оптимального контроля астмы удаётся достигнуть лишь у незначительной части пациентов, несмотря на соблюдение всех международных рекомендаций и Федеральных стандартов лечения. Неконтролируемое течение болезни обусловлено не только слабой приверженностью к лечению некоторых больных, но и, прежде всего, этиопатогенетическими различиями путей её формирования.

Полученные нами данные свидетельствуют о наличии сложно-подчинённых взаимодополняющих причин прогрессирующего течения болезни, обусловленных влиянием факторов окружающей среды, генетической предрасположенностью и эндогенным ответом на одиночное либо множественное воздействие нескольких физических триггеров одновременно.

Как показали наши исследования, в общей популяции больных бронхиальной астмой более чем в 30% случаев имеется чрезмерно высокая чувствительность бронхов к сочетанному действию природно-климатических стимулов, таких как температура и влажность окружающего воздуха, что ухудшает у них уровень контроля над заболеванием. Скорее всего, у этих больных существует единый или, по крайней мере, близкий механизм формирования холодиндуцированной и осмоиндуцированной реакции бронхов. Прежде всего, он может быть связан с изменением в регуляции чувствительных окончаний афферентных нервов дыхательных путей и с воспалением, которое в состоянии нарушить экспрессию генов, вовлечённых в продукцию

нейропептидов, нейромедиаторов, а также различных ионных каналов, несущих двойную ответственность за изменение температурной и осмотической реактивности респираторного тракта.

Среди последних главенствующую роль следует отвести семейству катионных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP), опосредующих термо- и осморцепцию: TRPM8, TRPV1, TRPV4 и, предположительно, TRPV2 (Т. Taylor-Clark, В. J. Undem, 2006; R.-L. Lin et al., 2009). Эти рецепторные белки широко экспрессированы в респираторном тракте: на клетках бронхиального эпителия, клетках воспаления (тучных клетках, макрофагах), гладкомышечных клетках и чувствительных нервных окончаниях.

Доказано, что являясь неселективными проводниками ионов кальция, TRP-рецепторы при активации способны опосредовать множество патофизиологических эффектов, в том числе синтез и секрецию воспалительных медиаторов, гиперсекрецию муцинов, сокращение гладкой мускулатуры бронхов и т.д. (Д.Е. Наумов и др., 2012; A.S. Sabnis et al., 2008; L. Alenmyr et al., 2011; M.C. Li et al., 2011; D.E. Naumov et al., 2015).

2.3. Характер взаимосвязи клинических проявлений и функциональных особенностей гипо- и гиперосмолярной реактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой

Одним из механизмов ограничения скорости воздушного потока в ответ на различные гипо- и гиперосмолярные триггеры служит изменение осмотического градиента и ионного состава перицилиарной жидкости респираторного эпителия дыхательных путей. Это ведёт к активации тучных, других воспалительных клеток, стимуляции чувствительных нервных окончаний, в результате чего высвобождаются нейротрансмиттеры, гистамин, цитокины и другие медиаторы, которые вызывают сокращение гладких мышц (Ю.М. Перельман и др.,

2014; А.Г. Приходько и др., 2011; А.Г. Приходько и др., 2014; М. Abolhassani et al., 2008; S.D. Anderson, 2016). Исследования показывают, что осмозависимые бронхоспастические реакции среди больных бронхиальной астмой могут утяжелять течение болезни. Всестороннее исследование данных реакций позволит своевременно менять терапевтическую тактику ведения таких пациентов.

Мы сравнили клинические и функциональные особенности формирования гипо- и гиперосмотических реакций у 215 больных бронхиальной астмой (средний возраст $38,8 \pm 0,75$ лет) с длительностью заболевания от 1 до 5 лет и выше. На момент обследования большинство пациентов (76%) имели частично контролируемое (19%) и неконтролируемое течение болезни (57%). Уровень контроля заболевания, согласно валидизированного вопросника АСТ (Asthma Control Test, Quality Metric Inc., 2002), составлял в среднем по группе $17,9 \pm 0,8$ баллов.

Сбор данных о получаемой фармакотерапии показал, что из общего числа больных, включённых в исследование, 9% больных имели погрешности в получении базисной медикаментозной терапии, в 41% случаев пациенты принимали низкие и средние суточные дозы ингаляционных кортикостероидов в виде монотерапии в комбинации с короткодействующими бронхолитиками по требованию, 50% больных принимали иГКС в сочетании с длительно действующими β_2 -агонистами. Тип, длительность приёма и суточные дозы препаратов базисной терапии зависели от степени тяжести и контроля над заболеванием.

По данным анамнестического тестирования, 66% больных испытывали разнообразные жалобы при изменении условий влажности окружающего воздуха либо при выполнении интенсивной физической нагрузки. Это приводило к ухудшению состояния, сопровождаясь в 14% случаев удушьем, затруднённым дыханием (54%) в сочетании с усилением одышки (32%), кашлем, различным по интенсивности и характеру (39%), в некоторых случаях это проявлялось появлением осиплости голоса, заложенностью носового дыхания (19%). 34%

больных требовался дополнительный приём бронхолитика с целью купирования приступа. Для 56% больных была характерна одышка при выполнении тяжелой физической нагрузки, что соответствовало 1-2 ст. по шкале mMRC.

Клинические проявления раздражения дыхательных путей, выявленные у пациентов в условиях лаборатории при выполнении бронхопровокационных проб с ИДВ, ИГР и ДФН в основном повторяли ощущения, полученные при анамнестическом тестировании. В равной степени после обеих ингаляций у больных чаще всего возникал непродуктивный кашель, затруднение дыхания, ощущение диспноэ, которое они описывали больше как тяжесть в грудной клетке и/или дискомфорт при дыхании, осиплость и першение в горле, нарушение носового дыхания (рис. 6).

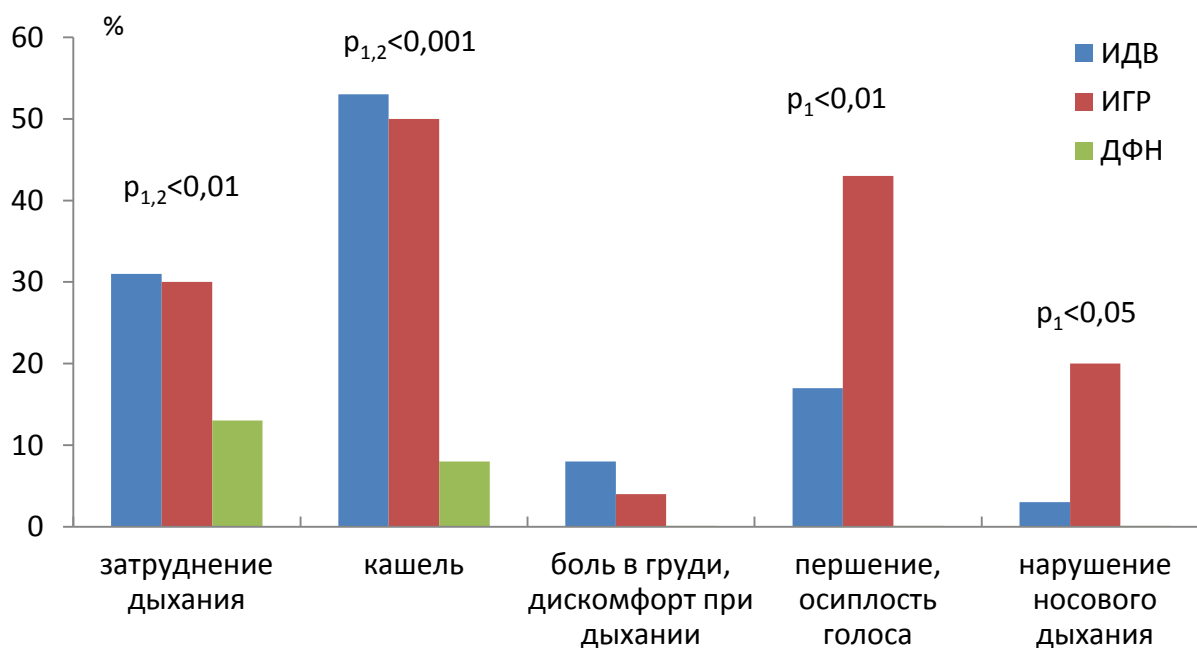


Рис. 6. Субъективные ощущения пациентов в ответ на бронхопровокацию (p_1 – достоверность различий в сравнении с реакцией на ИДВ; p_2 – в сравнении с реакцией на ИГР).

Вышеуказанные симптомы присутствовали у 61% больных после бронхопровокационной пробы с ингаляцией дистиллированной воды, в 63% случаев – после ингаляции гипертонического раствора и

в 13% – после дозированной физической нагрузки. Характерной особенностью в процессе и по окончании ингаляции было появление приступообразного кашля, клинические симптомы отличались многообразием и несколько превалировали над объективной картиной, полученной при спирометрическом исследовании.

Следует отметить, что не все больные смогли адекватно перенести предложенную им ингаляционную нагрузку дистиллированной водой. У 12% больных исследование было прекращено досрочно, сразу же после ингаляции изотонического раствора хлорида натрия, поскольку падение $ОФВ_1$ превышало установленные нами границы нормы, разброс значений составлял от -14% до -25% (в среднем $-16,0 \pm 2,1\%$). У двоих из этих пациентов та же ситуация повторилась на следующий день при попытке провести бронхопровокацию гипертоническим раствором хлорида натрия. Предварительная ингаляция физиологического раствора вызвала эпизод затруднённого дыхания, потребовавший введения короткодействующего β_2 -агониста.

При анализе динамики бронхиальной проходимости после бронхопровокационных проб у больных бронхиальной астмой в большинстве случаев наблюдались однонаправленные изменения параметров вентиляционной функции легких под воздействием различных осмотических стимулов, характеризовавшиеся их снижением (Е.Ю. Афанасьева и др., 2015). Падение показателей на ингаляционные стимулы (дистиллированная вода и гипертонический раствор) наступало сразу после прекращения исследования с равномерным снижением объемных скоростей форсированного выдоха, отражавших нарушение бронхиальной проходимости на всех уровнях дыхательных путей. В среднем по группе $\Delta ОФВ_1$ в ответ на бронхопровокационную пробу с ингаляцией дистиллированной воды составил $-7,3 \pm 0,9\%$; при ингаляции гипертонического раствора $-6,8 \pm 0,9\%$; при пробе с дозированной физической нагрузкой $-3,9 \pm 0,7\%$. Как видно на представленном ниже рис. 7, реакция дыхательных путей на аэрозольные триггеры почти в 2 раза превышала полученную в ответ на дозированную физическую нагрузку.

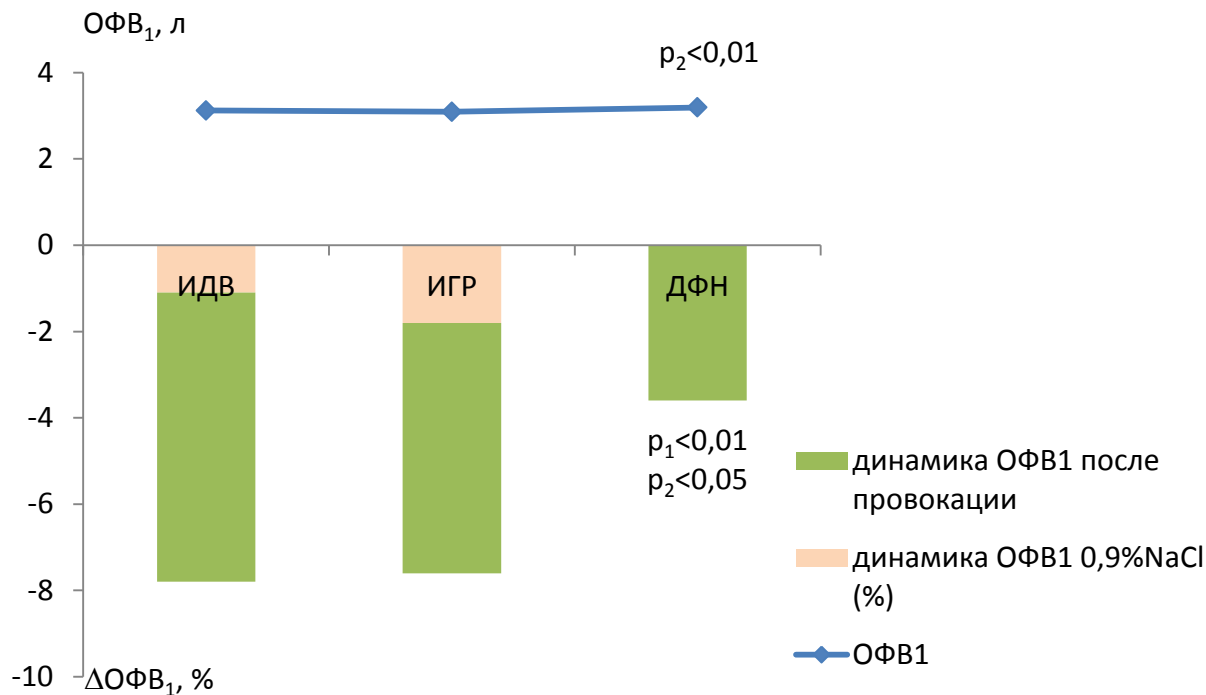


Рис. 7. Межсуточные значения базового ОФВ₁, измеренного перед проведением пробы и его динамика в ответ на бронхопровокационные пробы (p_1 – достоверность различий показателя в сравнении с ИДВ; p_2 – достоверность различий показателя между ИГР и ДФН (парный t- тест)).

На рис. 8 представлены гистограммы, показывающие частоту встречаемости изменений ОФВ₁ в диапазоне значений после проведенного тестирования. Диапазон изменений ОФВ₁ ($\Delta\%$) после ингаляции дистиллированной воды варьировал в пределах -5,1 (-11,0 и -0,4), после ИГР -4,6 (-10,25 и -0,4), после дозированной физической нагрузки -1,75 (6,5 и 1,4).

При сравнении степени бронхоконстрикторной реакции на разные стимулы максимальный ответ установлен для пробы с ингаляцией дистиллированной воды, достоверно отличавшийся от реакции на ингаляцию гипертонического раствора (табл. 9). Обращает на себя внимание, что лица, реагировавшие на аэрозольные стимулы, имели более низкие базовые значения показателя вентиляционной функции легких ОФВ₁, по отношению к больным, не ответившим на бронхопровокацию.

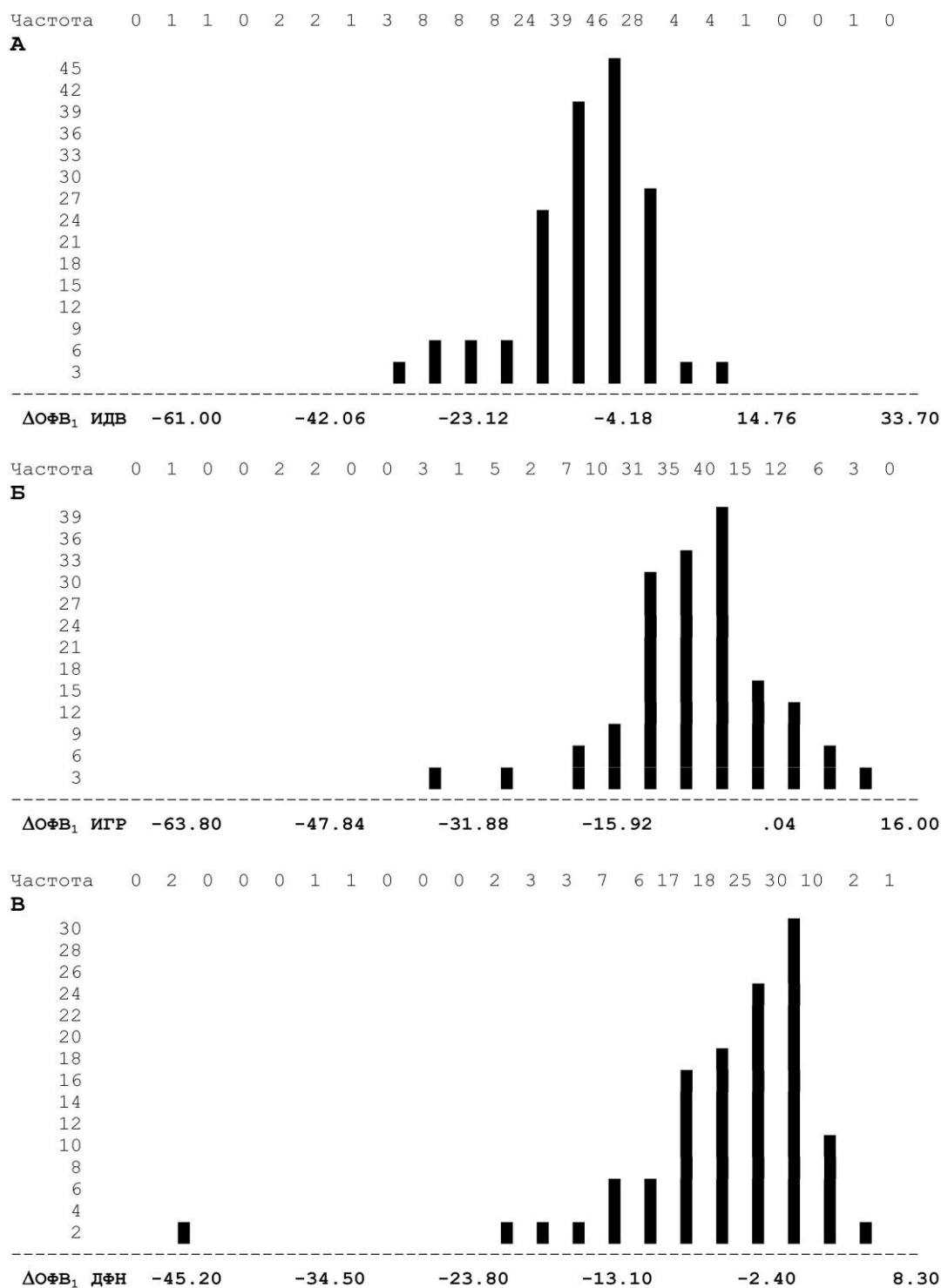


Рис. 8. Частота встречаемости значений ΔФВ₁ (%) после бронхопровокационных проб: ИДВ (А), ИГР (Б) и ДФН (В).

Оценивая воздухонаполненность легких как одну из важных составляющих тяжести астмы, мы обратили внимание на пациентов с высокой реактивностью на ИДВ, у которых было найдено увеличение остаточного объема легких (ООЛ) и, как следствие, возрастание его

отношения к общей емкости легких (ОЕЛ), свидетельствовавшие о роли персистирующей осмотической гиперреактивности дыхательных путей в формировании гиперинфляции легких у больных бронхиальной астмой (рис. 9).

Таблица 9. Вентиляционная функция легких и реакция дыхательных путей на бронхопровокационные стимулы.

Проба	ИДВ		ИГР		ДФН	
	ОФВ ₁	ΔОФВ ₁	ОФВ ₁	ΔОФВ ₁	ОФВ ₁	ΔОФВ ₁
Положительная	88,2±2,18	-21,2±1,70	91,9±2,41	-17,8±1,87 p ₁ <0,05	87,7±2,53	-19,5±1,99
Отрицательная	96,5±1,90 p<0,01	-2,4±0,60 p<0,001	96,5±2,04	-1,0±0,53 p<0,001	96,4±1,23 p<0,01	-0,3±0,40 p<0,001 p ₁ <0,001

Примечание: p - достоверность различий показателя между группами больных с положительной и отрицательной пробой, p₁ – в сравнении с ИДВ.

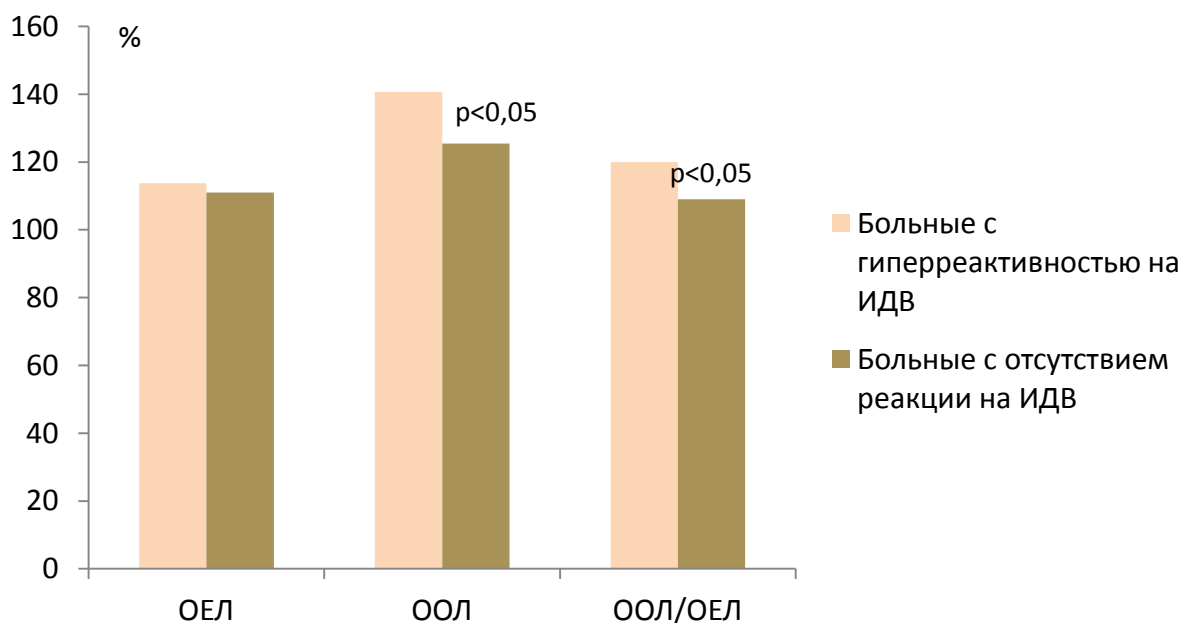


Рис. 9. Воздухонаполненность лёгких у больных с различной реакцией на ингаляцию дистиллированной воды. ОЕЛ – общая ёмкость лёгких, ООЛ – остаточный объем легких.

Падение ОФВ₁, свидетельствовавшее о наличии гиперреактивности дыхательных путей на ИДВ, было зарегистрировано у 37%

больных, на ИГВ – в 33% случаев, на ДФН – в 18%. На фоне получаемой фармакотерапии у астматиков чётко прослеживалась зависимость между уровнем контроля (АСТ) над заболеванием и реакцией бронхов в ответ на пробу ИДВ ($r=0,21$ $p<0,01$). Кроме того, была исследована взаимосвязь между ответами на вопросы, полученные во время предварительного тестирования пациентов, и возникавшей у них бронхоспастической реакцией в ходе выполнения провокационных проб.

Оказалось, чем большее количество баллов больными было набрано при оценке своего состояния в зимнее время года, тем более выраженную реакцию ($\Delta\text{ОФВ}_1$) они имели в пробе ИДВ ($r=-0,62$ $p<0,01$). Кроме того, чем интенсивнее они реагировали на низкую температуру и высокую влажность окружающего воздуха, тем сильнее проявлялась реакция со стороны дистальных дыхательных путей на ингаляцию дистиллированной воды ($r=-0,42$, $p<0,05$ и $r=-0,50$, $p<0,05$, соответственно).

Обращает на себя внимание существенное совпадение в реакциях на гипо- и гиперосмолярный стимулы, подаваемые в форме аэрозоля. Так, у пациентов, имевших гиперреактивность дыхательных путей на ИДВ, в 65% случаев была обнаружена и выраженная реакция бронхов на 4,5% раствор NaCl, тогда как на дозированную физическую нагрузку – всего лишь в 25% случаев. Несмотря на схожесть патофизиологических механизмов, лежащих в основе бронхоспазма, вызванного ингаляцией гипертонического раствора и физической нагрузкой, только 10% больных отреагировали достоверным падением показателей бронхиальной проходимости на оба эти стимула.

Особого внимания заслуживают больные, у которых после провокации было найдено увеличение ОФВ_1 больше пределов воспроизводимости, свидетельствовавшее о парадоксальном улучшении проходимости крупных бронхов в ответ на изменение осмолярности слизистой. Так, у 3% больных после провокации ИДВ и в 3% случаев после ИГР был отмечен прирост ОФВ_1 более чем на 10%. У двух из этих пациентов отмечались разнонаправленные реакции в ингаляционных

пробах на гипо- и гиперосмолярные растворы, у одного наблюдалось закономерное снижение $ОФВ_1$ в реакции на дистиллированную воду (падение составило 16%) и существенный прирост показателей при воздействии гипертонического раствора ($\Delta ОФВ_1=12\%$), у второго пациента ситуация была обратной, отмечался прирост $ОФВ_1$ в ответ на ИДВ (10%) и резкое снижение $ОФВ_1$ после ИГР (-63%).

В отдельную группу были выделены лица с сочетанной гиперреактивностью дыхательных путей на стимулы, поступающие в форме аэрозольных ингаляций: дистиллированную воду и 4,5% раствор хлорида натрия. В отличие от остальных, последние имели наиболее развёрнутую картину заболевания с более длительным анамнезом и выраженностью основных респираторных симптомов, у них присутствовали генерализованные нарушения бронхиальной проходимости, характеризовавшиеся достоверным снижением всех скоростных параметров ($ОФВ_1=83,9\pm 3,5\%$ долж.; $ОФВ_1/ЖЕЛ=68,8\pm 1,3\%$) и увеличением воздухонаполненности легких (рис. 10), как следствие, высокий прирост показателей в реакции на β_2 -агонист ($\Delta ОФВ_1=20,0\pm 3,6\%$). Эти пациенты показали более выраженное падение $ОФВ_1$ после проведения проб с ИДВ ($-22,0\pm 3,7\%$) и ИГР ($-19,0\pm 2,2\%$), они в меньшей степени реагировали на высокую влажность атмосферного воздуха.

Одновременно на этих больных усиливалось влияние низких температур: прослеживалась чёткая зависимость между ухудшением их состояния в зимний период года и степенью ответа дыхательных путей на ингаляцию дистиллированной воды ($r=-0,66$, $p<0,01$). Наряду с высокой лабильностью бронхов, в данной группе присутствовали начальные признаки появления необратимого компонента обструкции, связанного со структурной перестройкой респираторного тракта вследствие хронического воспаления.

Таким образом, в общей популяции больных бронхиальной астмой более чем в 30% встречается реакция на осмотические стимулы, в 65% случаев имеется высокая чувствительность бронхов к сочетанному действию осмотических стимулов.

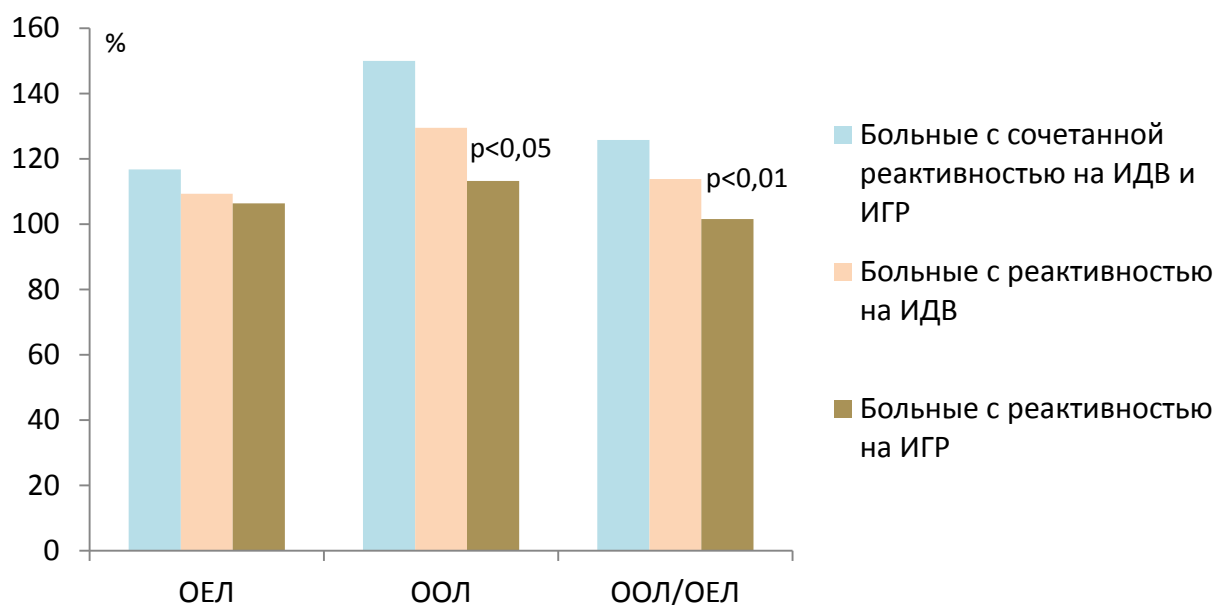


Рис. 10. Воздухонаполненность легких у больных с гиперреактивностью бронхов на аэрозольные стимулы (р - достоверность различий по отношению к больным с сочетанной реакцией).

2.4. Клинико-функциональные особенности реакции дыхательных путей на ингаляцию гипертонического раствора у больных бронхиальной астмой

Наряду с высокой влажностью, неблагоприятное влияние на органы дыхания может оказывать и низкое абсолютное и относительное содержание паров воды в атмосфере. По литературным данным, среднегодовое абсолютное содержание влаги в атмосферном воздухе приполярных областей ниже, чем в воздухе пустынь (Л.Н. Анапольская, И.Д. Копзнев, 1979). Кроме того, в условиях сурового климата низкая влажность воздуха характерна не только для открытого пространства, но и для закрытых помещений, что, безусловно, не лучшим образом влияет на слизистую дыхательных путей, вызывая ее гиперосмолярность и, как следствие, окислительный стресс, усиление клеточного воспаления, изменение секреции бронхиальной слизи и бронхоспазм (Ю.М. Перельман и др., 2008; А.Н. Одиреев и др., 2010; А.Г. Приходько и др., 2014). Такое же состояние характерно и для интенсив-

ных физических нагрузок, сопровождающихся гипервентиляцией с высушиванием дыхательных путей и гиперосмолярностью слизистой (S.D. Anderson, 2016).

Одним из диагностических маркеров, выявляющих осмотические нарушения в респираторном тракте больного бронхиальной астмой, может служить ингаляционная проба с гипертоническим (4,5%) раствором хлорида натрия (Т. Piotrowska et al., 2007). В основе пробы лежит возникающая дегидратация поверхностного слоя дыхательной трубки, приводящая к повышению его осмолярности, что сопровождается внутриклеточным стрессом, стимулирующим воспалительные каскады с повышенным образованием и выбросом во внеклеточную среду медиаторов воспаления (простагландины, лейкотриены, гистамин и др.), многие из которых обладают констрикторным действием на гладкую мускулатуру дыхательных путей. Допускают, что выраженность реакции на ИГР зависит во многом и от получаемого лечения, так как положительный ответ на непрямой стимул предполагает наличие эозинофильного, макрофагального, нейтрофильного воспаления в дыхательных путях, являющегося ключевым элементом патофизиологии бронхиальной астмы (J.D. Leuppi et al., 2005; J.D. Brannan, 2010).

Создавая гиперосмотическое состояние путем воздействия на дыхательные пути гипертонического раствора хлорида натрия, мы исследовали клинические симптомы и функциональные особенности проявления бронхоспазма у 185 больных бронхиальной астмой европеоидной расы, трудоспособного возраста ($40,6 \pm 1,1$ лет). Перед проведением аэрозольной бронхопровокационной пробы всем без исключения больным проводилось тестирование, включавшие ответы на вопросы по выявлению основных клинических симптомов заболевания, а также реагирования больных на экологически обусловленные стимулы (высокую или низкую влажность, температуру атмосферного воздуха, резкую смену погоды и т.д.), на физическую нагрузку, оценку контроля над заболеванием по валидизированному вопроснику Asthma Control Test (Quality Metric Inc., 2002).

Из всей совокупности обследованных лиц изменённая бронхиальная реактивность в ответ на бронхопровокацию гипертоническим раствором хлорида натрия была выявлена в 43% случаев. Оценивая клинический контроль над заболеванием и функцию внешнего дыхания, мы обнаружили, что больные, положительно реагирующие на стимул, имели достоверно более низкие значения показателей «поток-объем» форсированного выдоха, характеризующих проходимость мелких дыхательных путей, по отношению к больным, не реагирующим на стимул (табл. 10). Кроме того, согласно критериям вопросника АСТ, за последние 4 недели пациентам этой группы удавалось в меньшей степени контролировать своё заболевание.

Таблица 10. Сравнительная клинико-функциональная характеристика больных.

Показатель	Больные с положительной реакцией на ИГР	Больные с отсутствием реакции на ИГР	p
АСТ, баллы	17,0±0,8	19,6±0,9	<0,05
ОФВ ₁ , % долж.	90,8±2,6	95,7±2,2	>0,05
МОС ₂₅₋₇₅ , % долж.	56,4±3,4	67,7±4,2	<0,05
ΔОФВ ₁ , %, после 0,9% NaCl	-4,1±1,2	0,3±0,5	<0,01
ΔОФВ ₁ , %, после 4,5% NaCl	-11,9±2,2	-2,8±0,5	<0,001
ΔМОС ₂₅₋₇₅ , %, после 4,5% NaCl	-11,0±3,9	0,4±2,2	<0,01
ОЕЛ, % долж.	113,3±2,5	110,9±1,1	>0,05
ООЛ, % долж.	137,3±6,6	124,6±4,6	>0,05
ООЛ/ОЕЛ, % долж.	117,3±4,2	108,4±2,9	>0,05

Следует отметить, что не все больные смогли адекватно перенести предложенную им ингаляционную нагрузку. У 7% больных исследование было прекращено досрочно, сразу же после ингаляции изотонического (0,9%) раствора NaCl, поскольку падение ОФВ₁ превышало установленные границы нормы, разброс значений колебался от -11% до -25%, в среднем для этих пациентов показатель снижался на 14,3±1,4%.

В 33% случаев падение скоростных показателей ПОФВ регистрировалось на 1 минуте после окончания ингаляции гипертонического раствора с равномерным их снижением на всех уровнях бронхиальной проходимости, максимальное падение $ОФВ_1$ в среднем по группе составило $-17,9 \pm 1,8\%$. Интерес представляет группа больных (7%), у которых было зарегистрировано парадоксальное улучшение бронхиальной проходимости: $\Delta ОФВ_1$ составил в среднем по группе $+8,1 \pm 1,4\%$. Частота встречаемости значений $\Delta ОФВ_1$ (%) после проведения бронхопровокационной пробы представлена на рис. 11. На гистограммах видно, что значение параметра у лиц с гиперреактивностью на ИГР варьирует в пределах -13 ($-21,0$ и $-10,5\%$), у лиц с отсутствием реакции на ИГР его диапазон составил $-1,7$ ($-4,95$ и $1,4\%$).

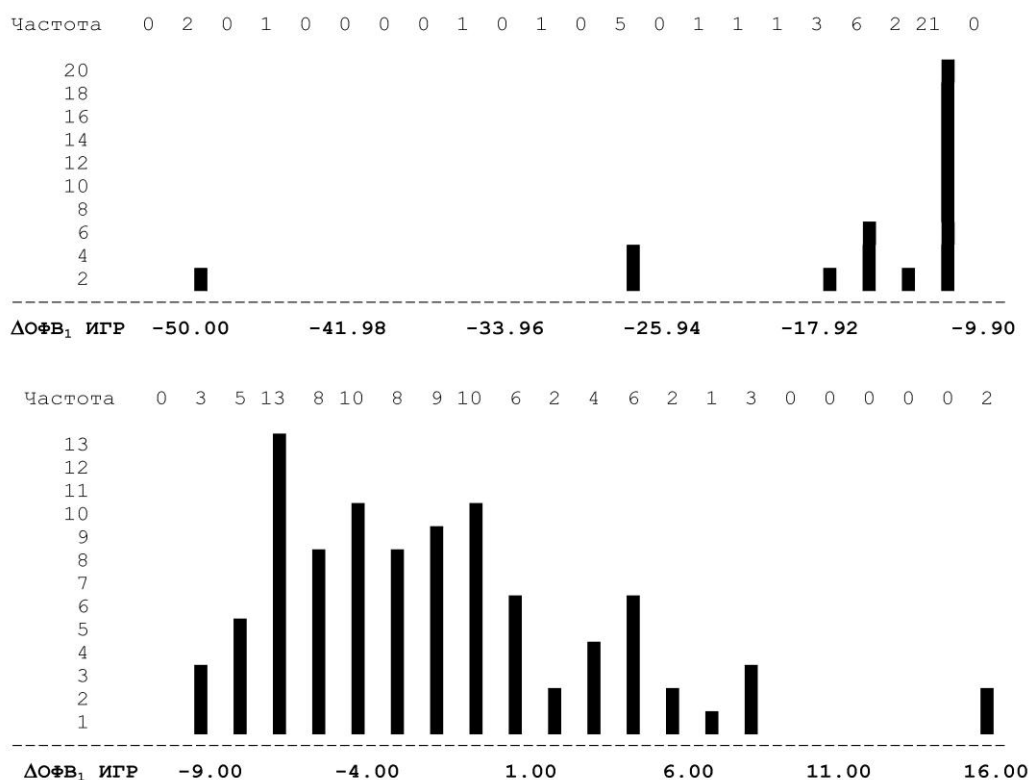


Рис. 11. Частота встречаемости значений $\Delta ОФВ_1$ (%) после бронхопровокационной пробы 4,5% раствором NaCl у лиц с положительной (верхняя гистограмма) и отрицательной реакцией (нижняя гистограмма) на стимул.

По клиническим данным, ИГР вызывала эпизоды затруднённого дыхания, различный по характеру кашель, першение в горле (табл. 11). Все больные с положительной реакцией на ИГР реагировали на

ингаляцию солевого раствора, как в процессе самой пробы, так и после неё чаще всего приступом удушья (в 22% – легкое затруднение дыхания, в 33% – умеренное, в 45% – тяжелое), в меньшей степени приступообразным продуктивным кашлем.

Таблица 11. Субъективные ощущения во время пробы ИГР (частота встречаемости признака представлена в процентах от общего числа больных в группе).

Симптомы	Больные с реакцией на 0,9% NaCl	Больные с положительной реакцией на ИГР	Больные с парадоксальной реакцией на ИГР	Больные с отрицательной реакцией на ИГР
Затруднение дыхания	4–80%	18–60%	-	-
Кашель с мокротой	-	11–36%	3–38%	5–11% p<0,05
Кашель сухой	-	6–20%	-	6–13%
Скованность в грудной клетке, дистанционные хрипы	-	3–10%	-	1–2%
Першение, ощущение кома в горле	-	10–33%	3–38%	13–28%
Осиплость голоса	-	1–3%	-	2–4%
Заложенность и выделения из носа	-	7–23%	-	5–11%

Примечание: p - достоверность различий между группами с положительной и отрицательной реакцией на ИГР.

В группе больных бронхиальной астмой с парадоксальной реакцией на ИГР у 3 человек из 8 после провокации также появилось ощущение скованности и тяжелое дыхание. У 4 пациентов с выраженной реакцией на изотонический раствор эпизод бронхоспазма сопровождался только затруднённым дыханием и хорошо купировался приёмом короткодействующего бронхолитика. Характерно, что среди

пациентов, не имевших какой либо реакции на гипертонический стимул, у 37% также присутствовали клинические симптомы раздражения дыхательных путей, сопровождавшиеся в большей степени сухим кашлем, першением в горле.

Обобщив полученные путем анкетного опроса данные, мы оценили субъективные ощущения больных и влияние на дыхание таких внешних стимулов как холод, высокая или низкая влажность окружающего воздуха, сочетанное воздействие этих факторов одновременно, воздействие холодной и ветреной погоды, физической нагрузки и т.д. Особое внимание обращали на увеличение частоты приёма бронходилататора во время контакта с триггерами или после их воздействия.

Оказалось, что пациенты с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул существенно чаще реагировали на низкую температуру и высокую влажность окружающего воздуха (рис. 12).

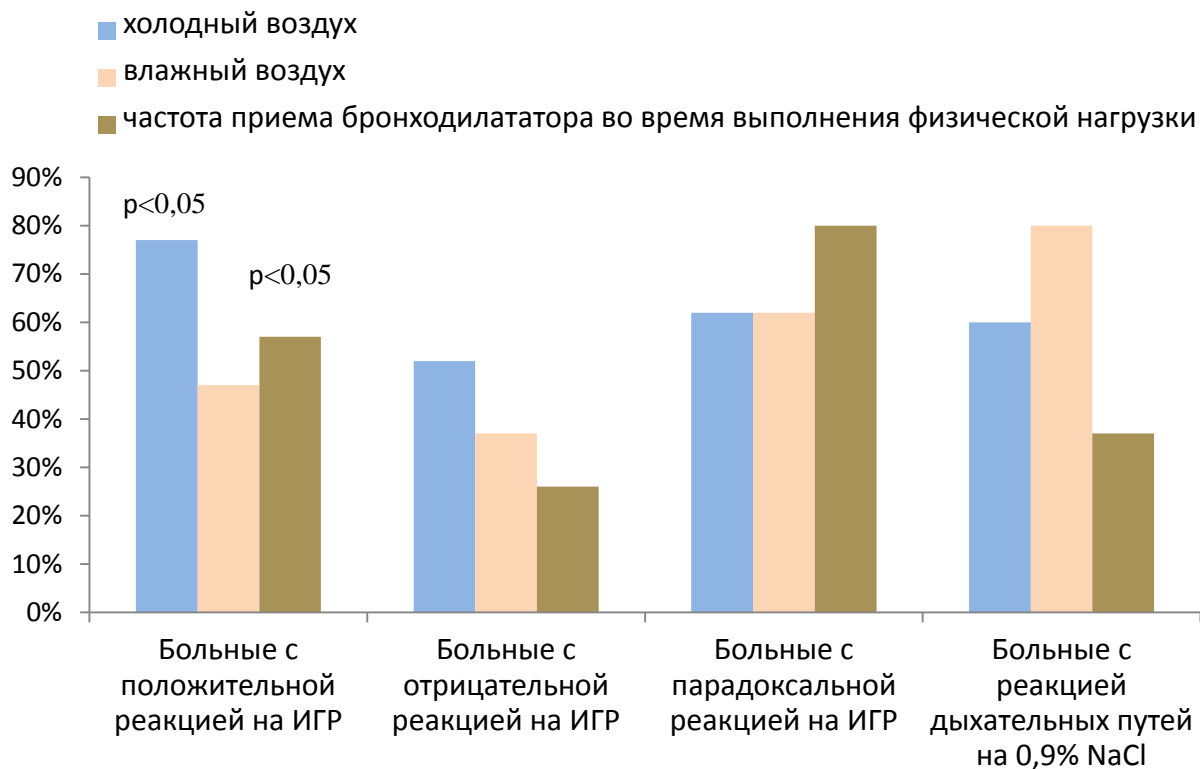


Рис. 12. Субъективные ощущения больных на изменение погодных условий и переносимость физической нагрузки (% от числа больных в группе).

Количество баллов, набранное пациентами во время тестирования, в данной группе составило $60,7 \pm 1,4$ баллов против $50,3 \pm 1,1$ баллов ($p < 0,001$) в группе с отсутствием реакции, что свидетельствовало в большей мере о тяжести состояния больных, но не о влиянии температурно-влажностных факторов на формирование гиперреактивности на гиперосмолярный стимул, поскольку прямой зависимости между набранным количеством баллов при анкетировании и бронхоконстрикторной реакцией на пробу ингаляцией гипертоническим раствором найдено не было.

О более тяжёлом течении заболевания свидетельствовало и то, что пациенты с гиперреактивностью на ИГР нуждались в дополнительном приёме бронходилататора. Для большинства из них клинически значимыми жалобами на воздействие натуральных триггеров были затруднённое дыхание, различный по интенсивности кашель, скованность в грудной клетке, менее специфичным признаком являлось появление заложенности носа, слизистого отделяемого из носа, осиплости голоса, першения в горле.

По данным клинического исследования, пациенты с измененной бронхиальной реактивностью имели наиболее развернутую картину заболевания по отношению к пациентам с отрицательной реакцией на пробу ИГР, характеризовавшуюся более длительным анамнезом ($6,1 \pm 1,0$ и $3,8 \pm 0,5$ лет, соответственно) и выраженностью основных респираторных симптомов: ежедневными эпизодами затрудненного дыхания, частой ночной симптоматикой, дистанционными хрипами при дыхании, интенсивным кашлем ($\chi^2 = 7,65$; $p < 0,05$). Такая симптоматика прослеживалась у больных как в общей группе с изменённой реакцией на ингаляцию гипертонического раствора, так и при распределении пациентов по характеру бронхомоторного ответа на стимул. При поступлении в клинику для пациентов с положительной и парадоксальной реакцией на триггер клинически значимыми оказались высокая интенсивность кашля и частые эпизоды затрудненного дыхания, которые более чем в 60% случаев носили ежедневный характер (рис. 13).

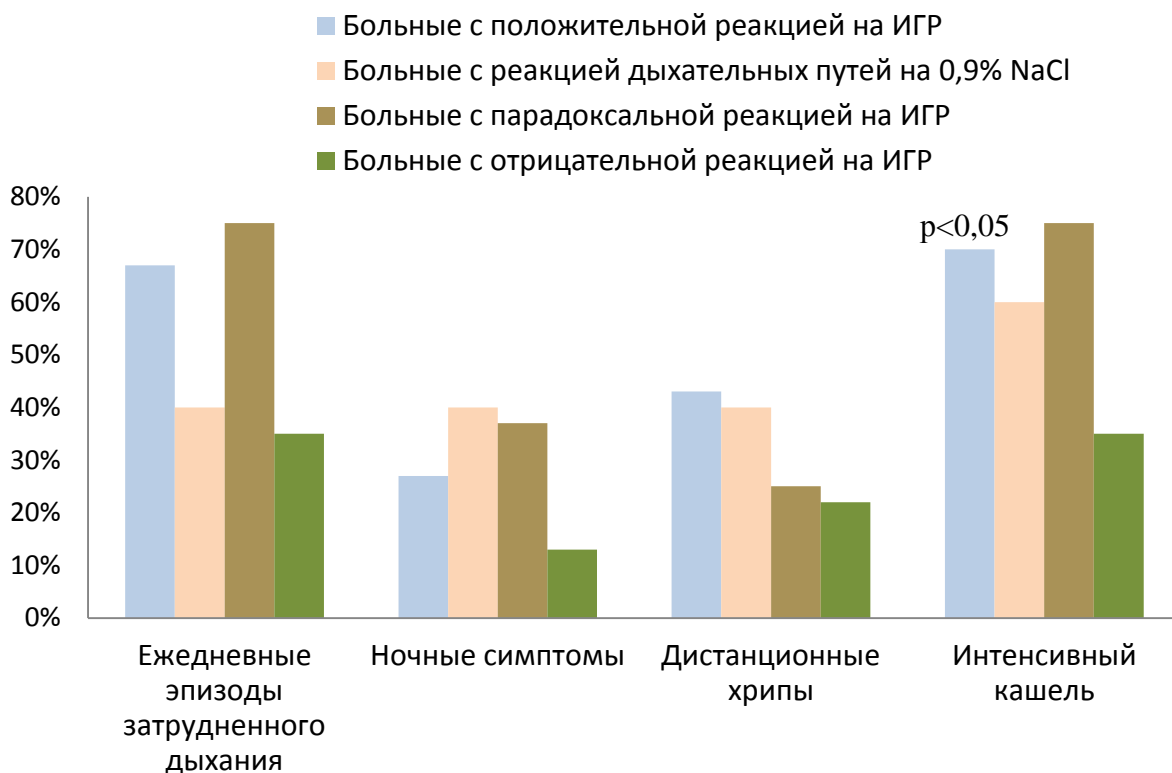


Рис 13. Характеристика больных по данным клинического обследования (% от числа больных в группе).

Таким образом, проведенные нами исследования показывают, что в 43% случаев у больных бронхиальной астмой встречается реакция на гиперосмолярный стимул. В 80% случаев она сопровождается высокой чувствительностью бронхов к действию климатических факторов, таких как низкая температура окружающего воздуха, его повышенная влажность. Эти факторы утяжеляют течение бронхиальной астмы, что проявляется более чем в 50% случаев большей частотой и выраженностью респираторных симптомов, недостаточным уровнем контроля заболевания.

Плохой контроль над заболеванием отягощает текущее состояние здоровья больного, существенно снижает качество жизни и является неблагоприятным прогностическим фактором в отношении будущих обострений бронхиальной астмы. Контролируемое течение заболевания означает не только внешнее благополучие пациента, связанное с отсутствием симптомов, но также контроль воспаления и реактивности дыхательных путей.

2.5 Функциональная характеристика и клинические проявления реакции дыхательных путей на физическую нагрузку у больных бронхиальной астмой

Известно, что тяжелая физическая нагрузка может служить одним из триггеров острого бронхоспазма (Е.О. Vianna et al., 2002). Распространённость постнагрузочного бронхоспазма в общей популяции людей достигает 10% (R.W. Gotshal, 2002), среди больных бронхиальной астмой регистрируется значительно чаще, порядка 20% (J.P. Parsons et al., 2013), но, по мнению некоторых исследователей, может достигать 70-90% (в зависимости от применяемых критериев его определения). Кроме того, данный феномен встречается у 35-40% людей, имеющих те или иные проявления аллергии, но не болеющих бронхиальной астмой.

Изолированно постнагрузочный бронхоспазм, как проявление неспецифической бронхиальной гиперреактивности, встречается редко, большей частью - на фоне других фенотипических вариантов течения бронхиальной астмы (А.Г. Приходько и др., 2011). Как правило, постнагрузочный бронхоспазм развивается в ближайшие минуты после прекращения физической нагрузки, реже – в процессе ее выполнения. Некоторые виды физической активности (например, бег) провоцируют бронхоспазм чаще, что необходимо учитывать при лабораторном проведении бронхопровокационных проб с дозированной физической нагрузкой и при диагностике бронхиальной астмы.

Интерес исследователей к изучению синдрома постнагрузочного бронхоспазма, его связи с течением бронхиальной астмы обусловлен прогрессирующей физической дезадаптацией таких больных, что, несомненно, является стрессовым фактором, мешающим нормальному образу жизни пациента, ухудшающим качество жизни и, следовательно, негативно влияющим на достижение контроля заболевания (Л.Г. Нахамчен и др., 2016; R.W. Gotshal, 2002; J.M. Weiler et al., 2010; S.R. Del Giacco et al., 2015).

Нами были обследованы 197 больных бронхиальной астмой с легким персистирующим частично контролируемым и неконтролируемым течением с целью определения частоты развития постнагрузочного бронхоспазма на фоне физического напряжения и поиска клинико-функциональных особенностей течения данного синдрома. Пациенты не имели выраженных обструктивных нарушений вентиляционной функции легких (ОФВ₁ в среднем $91,6 \pm 2,5\%$ должной величины) и обследовались на фоне стандартной медикаментозной терапии.

По реакции дыхательных путей на дозированную физическую нагрузку больные были разделены на две группы (рис. 14): в первую включены 36 пациентов с постнагрузочным бронхоспазмом, вторая - представлена лицами (161 человек), не имевшими патологической реакции со стороны бронхиального дерева на физическую нагрузку. На момент обследования уровень контроля над заболеванием для больных первой группы в среднем составлял $14,1 \pm 1,6$ баллов АСТ, для второй – $17,9 \pm 0,6$ баллов ($p < 0,05$).

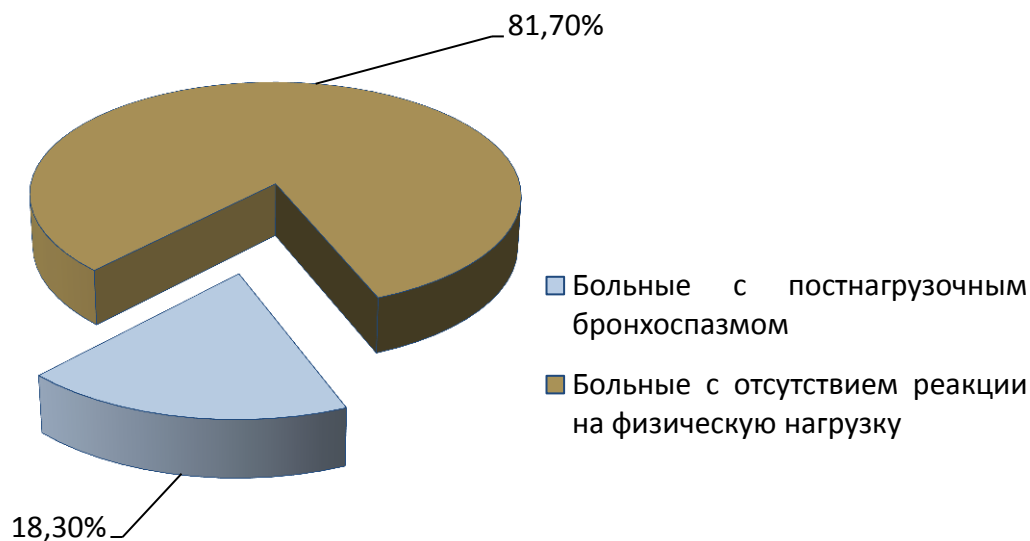


Рис. 14. Распределение больных бронхиальной астмой по результатам бронхопровокационной пробы (% от общего числа больных).

Как показало анкетирование больных, в повседневной жизни эпизод острого бронхоспазма в ответ на физическую нагрузку мог сопровождаться приступообразным кашлем, особенно в условиях низ-

ких температур и высокой влажности окружающего воздуха, хрипами, одышкой, степень их выраженности варьировала в зависимости от уровня самой нагрузки, её длительности и тяжести состояния больного.

По данным клинико-anamnestического тестирования, одышку при значительной физической нагрузке испытывали около 50% больных в каждой из сравниваемых групп ($\chi^2=1,08$, $p>0,05$), при легкой физической нагрузке – около 30% ($\chi^2=1,71$, $p>0,05$), не имели одышки – 12% в первой группе и 25% - во второй ($\chi^2=3,15$, $p>0,05$). У больных с постнагрузочным бронхоспазмом эпизоды затрудненного дыхания возникали в 3 раза ($\chi^2=3,97$; $p<0,05$), а кашель в 9 раз чаще ($\chi^2=5,86$; $p<0,05$) по отношению к пациентам, не имевшим реакции на стимул (рис. 15).

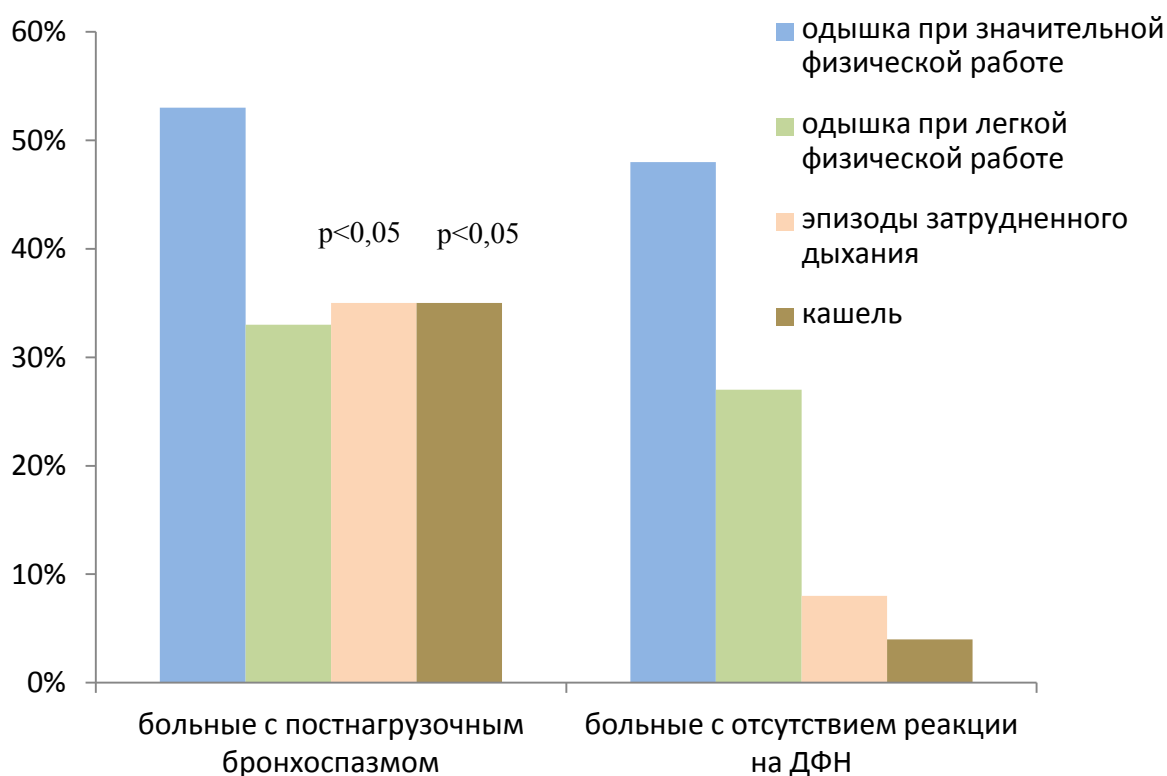


Рис. 15. Субъективные ощущения больных бронхиальной астмой при физической нагрузке (% от числа больных в группе). p - достоверность различий показателя между группами больных с наличием и отсутствием реакции на ДФН.

При оценке базовых значений вентиляционной функции легких с последующей проверкой на обратимость обструкции дыхательных путей спустя 15 минут после ингаляции 200 мкг сальбутамола было установлено, что больные с постнагрузочным бронхоспазмом исходно имели достоверно более низкие значения показателей, характеризующих бронхиальную проходимость и достоверно более высокий прирост $ОФВ_1$ после введения бронхолитического препарата (табл. 12). Согласно критериям вопросника АСТ, этим пациентам удавалось в меньшей степени контролировать своё заболевание.

Таблица 12. Вентиляционная функция и воздухонаполненность легких у больных бронхиальной астмой с различными типами реакции на ДФН.

Показатели	Группы наблюдения		p
	Больные с постнагрузочным бронхоспазмом	Больные с отсутствием реакции на ДФН	
ЖЕЛ, %	101,8±2,16	103,5±1,43	>0,05
ОФВ ₁ , %	88,3±2,51	95,1±1,44	<0,05
ПОС, %	88,7±3,73	100,9±1,71	<0,01
МОС ₅₀ , %	61,5±4,40	72,6±2,07	<0,05
СОС ₂₅₋₇₅ , %	59,2±4,70	70,0±2,10	<0,05
Δ ОФВ ₁ сальбутамол	15,5±2,10	9,3±0,73	<0,001
ОЕЛ, % долж.	98,4±3,5	103,6±1,6	>0,05
ООЛ, % долж.	104,7±9,3	109,7±4,4	>0,05
ООЛ/ОЕЛ, % долж.	102,1±5,9	101,9±2,9	>0,05

При тестировании в лабораторных условиях все больные адекватно выполнили и перенесли предложенную им дозированную физическую нагрузку. Выполненная в нагрузке работа в группе с бронхоспазмом на ДФН составила 100,9±4,6%, в группе с отсутствием реакции - 101,6±1,5% ($p>0,05$) от расчётной. Клиническими проявлениями со стороны дыхательных путей во время острой пробы были затруднённое дыхание, тяжесть в грудной клетке и/или дискомфорт при дыхании. Вышеуказанные симптомы встречались сразу после пробы у

13,9% больных первой группы и у 9,9% второй группы ($\chi^2=0,97$, $p>0,05$), к 10 минуте восстановительного периода клинически значимое затруднение дыхания, требовавшее купирование симптома и приёма бронхолитического препарата, испытывали 75% больных первой группы и 14,9% второй группы ($\chi^2=14,76$, $p<0,001$).

Частота встречаемости значений $\Delta\text{ОФВ}_1$ (%) после проведения бронхопровокационной пробы представлена на рис. 16.

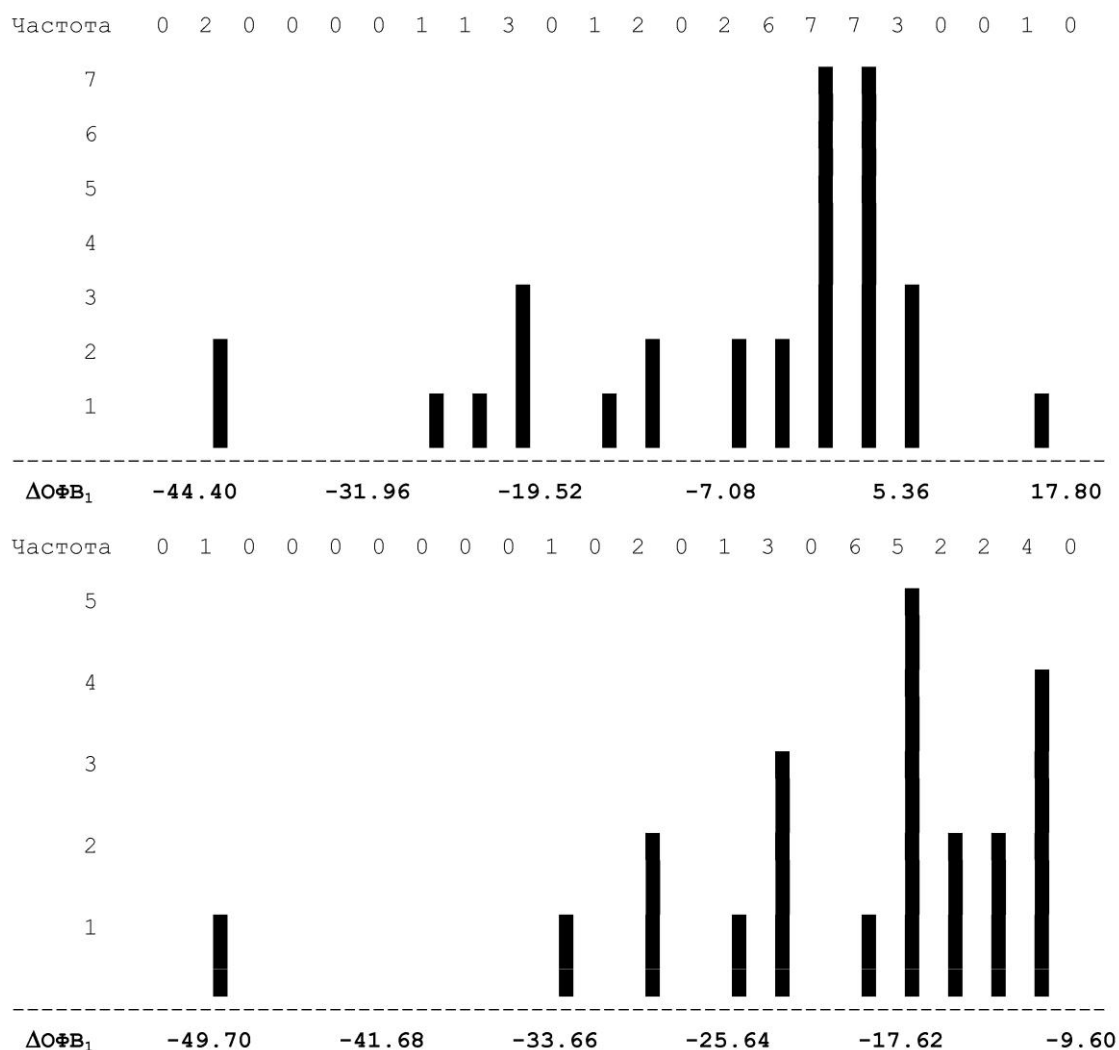


Рис. 16. Частота встречаемости значений $\Delta\text{ОФВ}_1$ на 1-й (верхняя гистограмма) и 10-й (нижняя гистограмма) минутах восстановительного периода у больных с постнагрузочным бронхоспазмом.

На гистограммах видно, что значение параметра у лиц с гиперреактивностью на ДФН варьирует в пределах 0,8 (-11,5 и 2,5) на пер-

вой минуте восстановительного периода, к 10 минуте изменения составляли -16,9 (-23,55 и -12,8). В среднем по группе на 1 минуте падение $ОФВ_1$ по отношению к исходной величине составило $-4,4 \pm 2,26\%$, однако у 8 больных падение показателя было значительным, колеблясь в пределах от -10,8 до -47,9%, что потребовало неотложного медикаментозного вмешательства. У основной массы пациентов (28 больных) значимое падение $ОФВ_1$ наступало к 10 минуте восстановительного периода после окончания дозированной физической нагрузки и составляло в среднем $-19,2 \pm 2,6\%$.

В целом, из 36 больных бронхиальной астмой с положительной реакцией на дозированную физическую нагрузку у 25% была выявлена бронхоспастическая реакция на 1 минуте восстановительного периода, у 75% – к 10 минуте восстановительного периода. У каждого 10-го пациента ухудшение бронхиальной проходимости не сопровождалось какой-либо клинической симптоматикой, что само по себе было интересно и свидетельствовало о том, что не все больные в повседневной жизни могут объективно оценить своё состояние при выполнении физической нагрузки. Кроме того, оценивая ответы на вопросы больных, полученные при анкетировании, мы также не нашли параллелей между количеством набранных баллов и последующей реакцией дыхательных путей на ДФН. Субъективные ощущения больных, касающиеся переносимости физической нагрузки, по результатам анкетного опроса, в большей степени зависели от степени контроля над заболеванием по данным вопросника АСТ ($r=-0,46$; $p<0,001$) и влияли на работоспособность пациентов во время лабораторного тестирования ($r=-0,30$; $p<0,05$).

В группе больных, не имевших реакции на ДФН, сразу после прекращения теста наблюдался прирост $ОФВ_1$, в среднем на $2,7 \pm 0,31\%$ ($p<0,001$), у 21 больного этой группы регистрировалось увеличение $ОФВ_1$ выше пределов воспроизводимости, т.е. более 4,6% (от 5,3 до 22,3%). Гистограмма распределения значений $\Delta ОФВ_1$ в заданном интервале на 1 и 10 минутах восстановительного периода представлена на рис. 17. У 4 пациентов из 21 сохранялись высокие

значения $ОФВ_1$ по сравнению с исходными данными сразу после нагрузки, а также на 10 минуте восстановительного периода. Максимальное снижение показателя было зарегистрировано на 10 минуте восстановительного периода и составило в среднем $-0,14 \pm 0,31\%$.

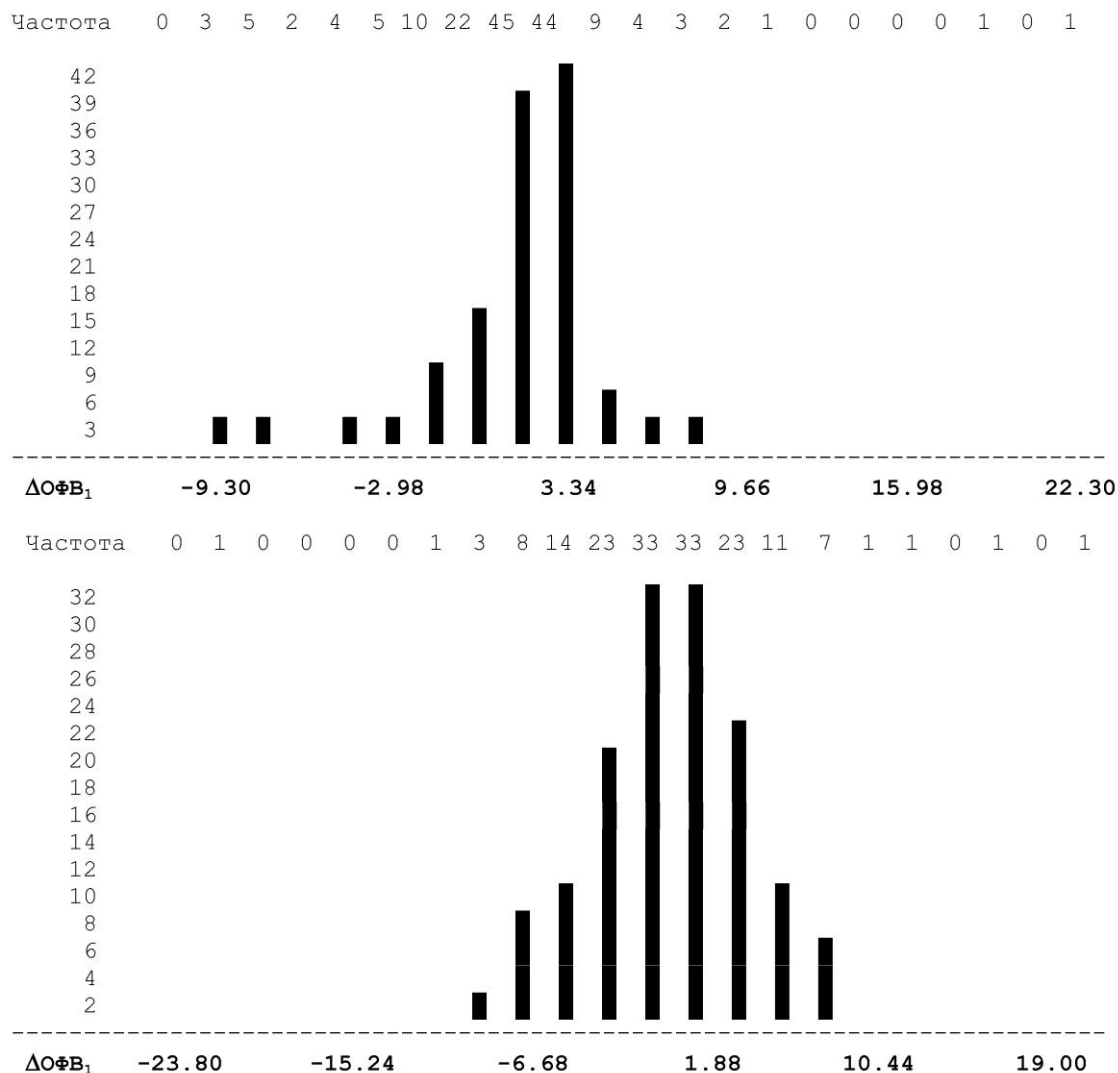


Рис. 17. Частота встречаемости значений $\Delta ОФВ_1$ на 1-й (верхняя гистограмма) и 10-й (нижняя гистограмма) минутах восстановительного периода у больных с отсутствием реакции на ДФН.

На общей совокупности больных бронхиальной астмой был проведён корреляционный анализ, обнаруживший тесную взаимосвязь между исходным значением $ОФВ_1$ (%) и его изменением в ответ на дозированную физическую нагрузку ($\Delta ОФВ_1$), измеренным на 1 минуте ($r=0,19$; $p<0,05$) и 10 минуте восстановительного периода

($r=0,19$; $p<0,05$). В свою очередь, степень выраженности ответной реакции бронхов ($\Delta\text{ОФВ}_1$) на 10 минуте восстановительного периода у больных с гиперреактивностью дыхательных путей на физическую нагрузку напрямую была связана со степенью контроля над заболеванием по данным вопросника АСТ ($r=0,56$; $p<0,05$).

Непосредственной причиной постнагрузочного бронхоспазма является гиперосмолярность слизистой дыхательных путей вследствие высушивания поверхностного слоя, возникающего в процессе гипервентиляции, сопровождающей интенсивную физическую нагрузку. Гиперосмолярность инициирует не только бронхоконстрикцию, но и бронхиальную гиперсекрецию, может усиливать воспаление, а также реакцию к холодному воздуху (Э.В. Некрасов и др., 2014).

Известно, что интенсивные физические нагрузки в течение длительного периода времени в сочетании с неблагоприятными условиями окружающей среды способны вызывать и поддерживать воспалительные изменения в дыхательных путях. Воспаление дыхательных путей при бронхиальной астме с постнагрузочным бронхоспазмом, как правило, носит эозинофильный характер (M. Duong et al., 2008). Опубликованы данные, которые свидетельствуют о том, что физическая нагрузка вызывает гиперпродукцию лейкотриенов, в частности цистеиниловых (C4, D4 и E4) в дыхательных путях у пациентов с постнагрузочным бронхоспазмом (T.S. Hallstrand, 2012). Было показано, что у больных бронхиальной астмой после физической нагрузки в конденсате выдыхаемого воздуха происходит увеличение уровня цистеиниловых лейкотриенов, в большей степени у лиц с постнагрузочным бронхоспазмом, их содержание тесно коррелирует с тяжестью реакции на нагрузку (A. Vikov et al., 2010). Известно, что лейкотриены являются одними из самых мощных бронхоконстрикторов и приводят к повышению проницаемости капилляров, что влечёт за собой экссудацию плазмы и отёк слизистой бронхов. Кроме того, цистеиниловые лейкотриены являются хемоаттрактантами эозинофилов, вызывают приток этих клеток в слизистую оболочку дыхательных путей, тем

самым усугубляя воспалительный процесс (M. Duong et al., 2008), что в свою очередь, приводит к снижению контроля над заболеванием.

Как показали наши исследования, уровень контроля над заболеванием тесно коррелировал с гиперреактивностью дыхательных путей на физическую нагрузку. У 70% больных с постнагрузочным бронхоспазмом было выявлено отсутствие контроля бронхиальной астмы (АСТ менее 20 баллов) и только 30% больных удавалось хорошо контролировать астму в последние 4 недели перед проведением теста.

Таким образом, в клинической симптоматике у больных с частично контролируемым и неконтролируемым течением бронхиальной астмы с постнагрузочным бронхоспазмом значительно чаще, чем у пациентов с отрицательной реакцией на дозированную физическую нагрузку, возникают эпизоды затрудненного дыхания и кашель. Степень контроля над заболеванием тесно связана с гиперреактивностью дыхательных путей на физическую нагрузку. Полное ингибирование постнагрузочного бронхоспазма у пациентов с астмой может служить полезным маркером контроля воспаления дыхательных путей.

Глава 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОСМОТИЧЕСКОЙ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

3.1. Понятие об осмотическом стрессе как защитной реакции клетки, его молекулярные механизмы

Осмотическое давление – важный физиологический параметр жидких сред организма. Составляя в норме около 300 мосм/л (для плазмы крови), осмолярность тщательно поддерживается на постоянном уровне за счет механизмов системной осморегуляции, в основном заключающихся в контроле экскреции воды и ионов натрия почками с участием гормонов окситоцина и вазопрессина. Однако стоит помнить, что эффективность системных механизмов ограничена, поскольку они активируются лишь в случае, когда происходит изменение осмотического давления в желудочно-кишечном тракте, либо в плазме крови. Учитывая инерционность этого процесса, многие клетки в неблагоприятной осмотической среде обречены на гибель, поскольку клеточная мембрана обладает достаточно высокой водонепроницаемостью. Этого не происходит, поскольку каждая клетка способна самостоятельно реализовывать оперативный комплекс мер, направленный на устранение возникшего дисбаланса в осмотическом давлении. Подобная реакция, имеющая по существу, адаптивный характер, именуется осмотическим стрессом (либо осмотическим шоком).

Так, увеличение осмотического давления во внешней среде вызывает выход воды из клетки, что сопровождается уменьшением клеточного объема (сморщиванием) и увеличением внутриклеточной концентрации растворенных низко- и высокомолекулярных соединений. Снижение осмотического давления, напротив, приводит к поступлению избыточного количества воды в клетку и ее набуханию.

Изменения объема клетки неизбежно сопровождаются механическими деформациями клеточной мембраны, которые также передаются на актиновый цитоскелет, и, таким образом, затрагивают всю клетку, включая ядро (J.D. Finan, F. Guilak, 2013). Именно поэтому, осмотический стресс также может рассматриваться как механический стресс для клетки.

В зависимости от типа возникшего осмотического нарушения возможные реакции клетки будут направлены на снижение (в случае гипоосмолярности среды) или увеличение (при гиперосмолярности) клеточного объема. В первом случае, удаление излишка воды происходит за счет осмоса – активизируется транспорт ионов (преимущественно K^+ и Cl^- , но также Na^+ и HCO_3^-), аминокислот, сахаров, спиртов и других осмолитов (в основном это таурин, бетаин, миоинозитол), увлекающих за собой воду за пределы клетки (D.F. Perelman, L. Goldstein, 1999). Транспорт осмолитов осуществляется с помощью соответствующих переносчиков и происходит с участием анионных RVD-каналов (J. Fürst et al., 2002). В случае увеличения внеклеточного осмотического давления начинается перенос ионов Na^+ в клетку, чтобы удержать воду, а кроме того, поскольку избыток ионов также вреден, увеличивается концентрация органических осмолитов, описанных ранее, как за счет синтеза, так и за счет активации трансмембранного транспорта.

Активность осмопротективных генов в основном находится под контролем транскрипционного фактора NFAT5. Впервые данный фактор был обнаружен в клетках мозгового вещества почек, которые в физиологических условиях подвержены воздействию высокой осмолярности (W. Neuhof, F.X. Beck, 2005). Здесь, под контролем NFAT5 находится экспрессия альдозоредуктазы (AR), бетаин-γ-аминобутиратного транспортера (BGT-1), натрий миоинозитольного транспортера (SMIT), тауринового транспортера (TauT), белка теплового шока 70 (HSP70) и аквапорина 2 (AQP-2) (M.V. Burg et al., 1997). Помимо NFAT5, большую роль играют такие факторы транскрипции, как AP-1 и EGR-1. Считается, что они участвуют в раннем ответе на

изменение осмолярности, активируя экспрессию различных факторов роста, структурных белков, молекул адгезии и других факторов транскрипции (M. Fu et al., 2003).

Установлено, что в условиях осмотического стресса активируются механизмы с участием белков p53 и GADD45, предотвращающие повреждение ДНК за счет временной приостановки клеточного цикла (N. Dmitrieva et al., 2000; S.K. Mak, D. Kültz, 2004). Для предотвращения нарушений фолдинга белков при гипер- и гипоосмолярности стимулируется синтез белков-шаперонов, к которым относится прежде всего семейство белков теплового шока (например, HSP27, HSP70, OSP94, α B-кристаллин) (S. Dasgupta et al., 1992; R. Kojima et al., 1996; S.K. Woo et al., 2002; W. Neuhofer et al., 2005). Наряду с NFAT5, определенное значение в этом процессе имеет фактор HSF-1, роль которого может в особенности возрастать при гипоосмотическом стрессе, в то время как для NFAT5 продемонстрировано участие в большей степени при возрастании осмотического давления (L. Caruscio et al., 1997; K. Christoph et al., 2007).

Важнейшую роль при гиперосмотическом стрессе играют органические осмолиты, позволяющие удержать воду в клетке без повышения концентрации неорганических ионов. К наиболее изученным осмолитам относятся сорбитол, мио-инозитол, бетаин, глицерофосфохолин, а также таурин. Так, концентрация сорбитола возрастает благодаря активизации синтеза альдозорезуктазы, катализирующей образование сорбитола из глюкозы. Мио-инозитол и бетаин поступают в клетку благодаря активному транспорту с участием переносчиков SMIT и BGT-1, экспрессия которых возрастает в гипертонической среде (H. Miyakawa et al., 1999). Образование глицерофосфохолина происходит путем деацетилирования фосфотидилхолина фосфолипазами A1 и A2, а также лизофосфолипазой. В случае гиперосмотического стресса, тормозится активность фосфодиэстеразы, разрушающей глицерофосфохолин, что приводит к накоплению осмолита (H.G. Bauernschmitt, R.K. Kinne, 1993). Осмолитами могут служить некоторые аминокислоты, например глицин, аланин и таурин. Как правило,

все они захватываются из внеклеточной среды и переносятся в клетку с участием специализированных белков-переносчиков, активность которых возрастает при повышении осмолярности (S. Uchida et al., 1992; R.R. Alfieri et al., 2001).

Интересно, что в ряду дополнительных механизмов, вовлеченных в ответ на осмотический стресс, находится увеличение активности циклооксигеназы COX-2, что сопровождается синтезом простагландинов, вероятно, выполняющих цитопротекторную роль. В том числе, такая реакция была установлена и для клеток альвеолярного эпителия (W.C. Lim et al., 2005).

Однако не все реакции клеток на осмотический стресс ограничиваются осмоадаптацией. В некоторых случаях неблагоприятная осмолярность среды способна индуцировать иммунный ответ с секрецией провоспалительных цитокинов иммунными и эпителиальными клетками. Экспериментальные данные свидетельствуют, что у мышей дефект в гене NFAT5 в гетерозиготном состоянии приводил к подавлению клеточной дифференцировки в лимфоидных органах (количество Т- и В-клеток снижалось на 30%) и снижению продукции антител в ответ на антигенную стимуляцию в условиях гиперосмолярности (W.Y. Go et al., 2004). В дополнение к этому под контролем NFAT5 находятся гены цитокинов TNF- α , лимфотоксин- β , а также интерлейкины -1, -6, -8, -18, и RANTES, содержащие в промоторе консенсусную последовательность для связывания NFAT5 (N.J. Wilmsen et al., 1994; C. López-Rodríguez et al., 2001).

Механизмы, с помощью которых осуществляется клеточная осморцепция, в настоящее время остаются не до конца изученными. Один из них может заключаться в непосредственной активации NFAT5 в условиях гиперосмолярности (J.D. Ferraris et al., 2002). Тем не менее, по-видимому, он не является основным, поскольку у NFAT5 было обнаружено несколько сайтов фосфорилирования для различных киназ (J. Aramburu et al., 2006), что говорит о наличии вышележащих механизмов активации и предполагает участие нескольких сигнальных путей, запускаемых рецепторами, расположенными в

плазматической мембране. Так, было обнаружено, что в активации NFAT5 в почках принимают участие рецепторы эпидермального фактора роста EGF (С. Küper et al., 2009), а в лимфоидных органах и очагах воспаления роль активатора NFAT5 принадлежит якорному белку 13 протеинкиназы А (AKAP13, Brx) (Т. Kino et al., 2009), который увеличивает экспрессию транскрипционного фактора при изменениях в структуре цитоскелета с участием сигнального каскада JIP4>MKK3/MKK6>p38MAPK>c-Fos/IRF>AP1/ISRES. В дополнение к указанным механизмам, результаты, полученные в последние десятилетия, позволили установить осморцепторную роль для каналов с транзитным рецепторным потенциалом семейства TRPV, ранее считавшихся терморцепторами (G. Owsianik et al., 2006).

3.2. TRP-каналы как рецепторы осмотического давления – краткая структурно-функциональная характеристика

Семейство каналов с транзитным рецепторным потенциалом (TRP) представляет собой гомологичные по структуре тетрамерные мембранные белки, каждая субъединица которых состоит из шести трансмембранных доменов, а также внутриклеточных N- и C-терминальных концов. На сегодняшний день выделяют 7 подсемейств TRP каналов: TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML, TRPA и TRPN (отсутствует у млекопитающих) (рис. 18). Спектр воспринимаемых раздражителей для каждого подсемейства сильно различается и включает термические, механические, химические, осмотические и болевые стимулы (В. Nilius, Т. Voets, 2005).

Подсемейство ваниллоидных TRP каналов (TRPV) включает 6 представителей. Первый катионный канал (TRPV1) был описан в 1997 году как термочувствительный капсаициновый рецептор (М.Д. Caterina et al., 1997). Тогда же был открыт OSM-9 – близкий гомолог TRPV у *C. elegans*, а также установлены его механо- и осморцепторные свойства (Н.А. Colbert et al., 1997). Позже были обнаружены остальные представители (TRPV2, -3 и -4). TRPV1-4 являются низкоселек-

тивными катионными каналами по отношению к би- и моновалентным катионам (Т. Voets, В. Nilius, 2003), а TRPV5-6 – селективными кальциевыми каналами, поскольку играют важную роль в реабсорбции кальция в почках и кишечнике (Т. Nijenhuis et al., 2003). В отличие от последних, TRPV1-4 также являются терморцепторами: TRPV3 и TRPV4 активируются при температурах свыше 31°C и 27°C, соответственно, TRPV1 – свыше 42°C, а TRPV2 – свыше 52°C (М. Tominaga et al., 1998; М. J. Caterina et al., 1999; W. Liedtke et al., 2000; G. D. Smith et al., 2002).

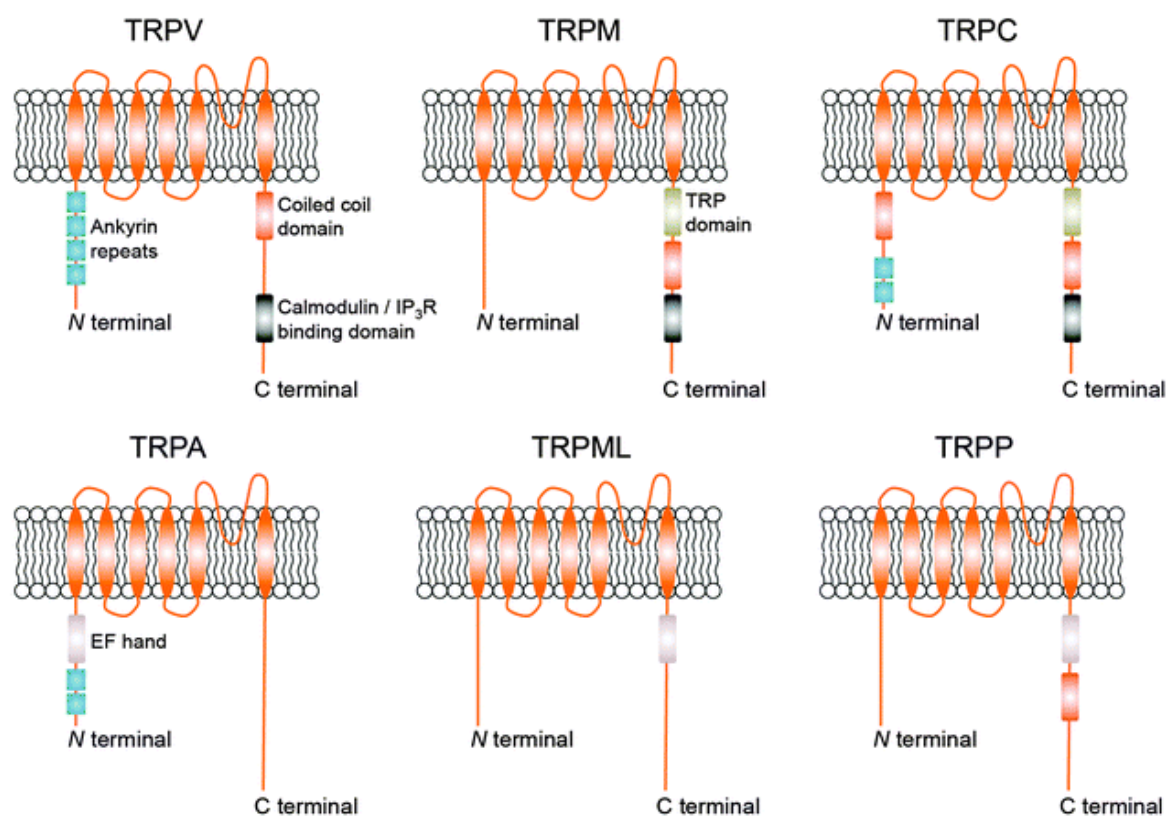


Рис. 18. Доменная организация различных подсемейств TRP каналов (Т. Rodrigues et al., 2016).

Изучение осмотической чувствительности TRPV стало возможным благодаря экспериментальным моделям, реализующим «выключение» интересующих генов у лабораторных животных. У мышей, нокаутных по гену *TRPV1*, отмечалось нарушение нормальной чув-

ствительности нейронов гипоталамуса к осмотическим стимулам, а также отсутствовала реакция на растяжение мочевого пузыря и тонкого кишечника (L.A. Birder et al., 2002; W. Rong et al., 2004; R. Sharif Naeini et al., 2006). Таким образом, отчетливо прослеживается роль TRPV1 как осмо- и механорецепторов, причем данные катионные каналы ответственны за рецепцию именно повышенного осмотического давления (S. Ciura, C.W. Bourque, 2006). Интересно, что температурный и осмотический стимулы способны действовать синергично в отношении активации TRPV1. Гипертонический стимул вызывал лишь небольшое увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} при комнатной температуре (24°C), однако сила реакции существенно возрастала при 36°C. Снижение осмолярности сопровождалось незначительным угнетением активности TRPV1 (E. Nishihara et al., 2011).

Осмотическая чувствительность TRPV4 была впервые описана W. Liedtke et al. (2000), что отразилось в первоначальном наименовании канала – vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC). Гипоосмотическая стимуляция клеток эпителия яичников CHO, экспрессирующих TRPV4, сопровождалась возрастанием внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , измеряемой по росту флуоресцентного сигнала. Примечательно, что активация канала наступала даже при очень незначительном (в пределах 1%) снижении осмотического давления от физиологического значения. Важные данные были получены J. Vriens et al. (2004). Согласно им, активация TRPV4 гипоосмотическим стимулом происходит опосредованно, с первичной активацией фосфолипазы A2, образованием арахидоновой кислоты и ее последующим метаболизмом в 5',6'-эпиксиэйкозатриеновую кислоту при участии цитохрома P450. Последняя, как известно, способна непосредственно активировать TRPV4 (H. Watanabe et al., 2003). Другим интересным фактом явилось то, что осмотическая чувствительность TRPV4 была максимальной при физиологических температурах (у млекопитающих - 37°C). Учитывая подобное поведение TRPV1, очевидно, что данная особенность является характерной для всех термо-осмочувствительных представителей подсемейства TRPV.

В отличие от гипоосмолярности, гиперосмотический стимул не оказывал на клетки никакого влияния, что говорит о специфической роли TRPV4 как гипоосмотического осморцептора. Эксперименты на мышах, нокаутных по гену *TRPV4*, свидетельствуют о вовлеченности данного рецептора в поддержание системного осмотического гомеостаза (W. Liedtke, J.M. Friedman, 2003; A. Mizuno et al., 2003).

Роль TRPV2 как осморцептора впервые была продемонстрирована на миоцитах аорты у мышей. Снижение осмотического давления окружающей жидкости приводило к набуханию миоцитов и растяжению мембраны. TRPV2, экспрессированные в мембране гладкомышечных клеток, демонстрировали способность к активации в этих условиях, что сопровождалось увеличением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (K. Muraki et al., 2003). Точный механизм активации TRPV2 при деформациях мембраны остается неизвестен, предполагается, что роль в этом процессе играет N-терминальный регион, содержащий анкириновые повторы. Его функциональная значимость подтверждается тем, что делеция данного участка сопровождалась угнетением термочувствительности каналов TRPV1 и TRPV4 (M.A. Schumacher et al., 2000; H. Watanabe et al., 2002).

Стоит отметить, что кроме представителей TRPV, способностью к осморцепции обладают и некоторые другие каналы TRP-семейства. Один из них, TRPM3, в наибольшей степени экспрессирован на эпителии почек. Снижение осмолярности внеклеточной среды вызывало набухание клеток и активацию канала, хотя и менее выраженную и более отсроченную, по сравнению с TRPV4 (G. Grimm et al., 2003). Исследование R. Lembrechts et al. (2010) установило коэкспрессию функциональных TRPV4 и TRPM3 на ресничном эпителии и экзокринных клетках дыхательных путей у мышей, что служит очередным доказательством комплексного механизма гипоосмотической рецепции.

Еще один осморцептор - TRPM7. Данный канал также демонстрировал способность активироваться при растяжении мембраны, вызванном набуханием клетки в гипоосмотической среде. Подавление

экспрессии TRPM7 с помощью РНК-интерференции замедляло восстановление нормального объема клетки после контакта с гипосмотической средой (T. Numata et al., 2007). Данные, полученные другой группой исследователей, также подтверждают чувствительность TRPM7 к снижению осмотического давления, но лишь при условии повышенной концентрации ионов Mg^{2+} внутри клетки. При этом гиперосмолярность, напротив, ингибировала активность катионного канала (B.F. Bessac, A. Fleig, 2007). Наконец, осморцепторная функция была открыта для TRPC5 – канала, наиболее экспрессированного в центральной нервной системе, и в меньшей степени в других тканях организма. В эксперименте активация TRPC5 происходила под действием гипосмолярности и искусственного растяжения клеточной мембраны (A. Gomis et al., 2008).

3.3. Возможные негативные последствия активации TRPV в аспекте респираторной патологии

Учитывая накопленные данные об экспрессии различных представителей TRPV в респираторном тракте, включая эпителий, эндотелий сосудов, секреторные клетки бронхиальных желез, гладкую мускулатуру, персистирующие в тканях и циркулирующие клетки иммунной системы, а также нервные окончания, логичным видится вопрос об их функциональной значимости. Столь обширное разнообразие типов клеток, экспрессирующих TRPV, свидетельствует о чрезвычайной гетерогенности возможных реакций, опосредуемых активацией данных рецепторов. Особый интерес вызывает роль TRPV в условиях патологии, когда нарушается привычное клеточное микроокружение и начинают работать сигнальные механизмы, нехарактерные для здорового организма.

Чувствительные нервные окончания блуждающего нерва, состоящие из медленных немиелинизированных волокон С-типа и формирующие разветвленную сеть в эпителиальной выстилке, являются преимущественным местом экспрессии TRPV1 (Y. Yamamoto et al.,

2007). Их активация может служить причиной развития бронхоконстрикции, гиперсекреции и кашля. Механизм развития этих явлений, по всей видимости, опосредуется в том числе т.н. аксон-рефлексом, при котором в ответ на раздражение происходит выделение нейропептидов (субстанции P, нейрокинина A, кальцитонин ген-связанного пептида), обуславливающих нейрогенное воспаление (R. Planells-Cases et al., 2005).

В эксперименте у животных дыхание горячим влажным воздухом вызывало бронхоконстрикцию, которая в значительной степени (но не полностью) блокировалась селективным антагонистом TRPV1 капсазепином, антагонистами нейрокининовых рецепторов 1 и 2 типа, а также атропином, что также подтверждает теорию о взаимосвязи TRPV1, нейропептидов и холинергических механизмов в формировании патологических реакций респираторного тракта (R.L. Lin et al., 2009). Именно этот комплекс механизмов может быть ключевым для развития гиперреактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой. В пользу этого говорит факт, что при генетической абляции чувствительных нейронов, экспрессирующих TRPV1, у сенсibiliзированных мышей фактически исчезала гиперреактивность, поскольку не удавалось индуцировать бронхоконстрикцию – один из основных патофизиологических феноменов заболевания (D. Tränkner et al., 2014). Есть и другие сообщения об участии TRPV1 в патогенезе бронхиальной гиперреактивности и эффективности его блокады для устранения данного явления (I. Delescluse et al., 2012). Более того, в работе R. Rehman et al. (2013) выключение гена TRPV1 приводило не только к ослаблению бронхиальной гиперреактивности, но и снижало воспаление, метаплазию бокаловидных клеток и фиброз, таким образом, влияя на ремоделирование дыхательных путей в экспериментальной модели IL-13-индуцированной астмы.

Большое внимание уделяется TRPV1, экспрессированным вне нервных клеток, прежде всего на эпителии, учитывая значимость нарушений на этом уровне у больных бронхиальной астмой и ХОБЛ. Установлено, что в бронхиальном эпителии TRPV1 способны повы-

шать секрецию некоторых цитокинов (IL-6, -8, TNF- α), запускать апоптоз, а также стимулировать секрецию муцина MUC5AC (B. Veronesi et al., 1999; C.A. Reilly et al., 2005; H. Yu et al., 2012). Тучные клетки также могут экспрессировать функциональные TRPV1-каналы, хотя их роль при этом остается неустановленной (T. Bíró et al., 1998; D. Zhang et al., 2012).

В отличие от тучных клеток, для TRPV1, экспрессированных на CD4⁺ лимфоцитах, установлена точная функциональная значимость - при блокаде канала они демонстрируют сниженную способность к активации (снижение синтеза спектра Th2 и Th17 цитокинов, а также фосфорилирования некоторых сигнальных белков), что обусловлено ингибированием сигнальных путей с участием NF- κ B, NFAT и MAPK. Таким образом, очевидной становится роль TRPV1 в развитии аллергического воспаления (R. Samivel et al., 2016). Кроме этого, не вызывает сомнений взаимосвязь TRPV1 с хроническим кашлем, эмфиземой и тяжелой, стероидно-резистентной бронхиальной астмой, поскольку отмечается, что у данных больных экспрессия TRPV1 существенно повышена (D.A. Groneberg et al., 2004; C. A. Butler et al., 2010; M. Baxter et al., 2012; L.P. McGarvey, 2014).

Немаловажно, что в условиях патологии чувствительность TRPV1 к внешним стимулам может быть повышена за счет снижения порога активации эндогенными факторами, такими как кислый pH и некоторые медиаторы воспаления (брадикинин, простагландин E2, метаболиты липоксигеназы) (A. Dhaka et al., 2009; M. Grace et al., 2012).

В отличие от TRPV1, канал TRPV4 экспрессирован в основном на эпителии трахеи, бронхов и нижележащих отделов респираторного тракта, в том числе в альвеолярных перегородках (D.F. Alvarez et al., 2006; J.M. Fernández-Fernández et al., 2008; R.N. Willette et al., 2008). Кроме этого, его экспрессия была зафиксирована на гладкой мускулатуре дыхательных путей и легочных сосудов (Y. Jia et al., 2004; A. Dietrich et al., 2006; X.R. Yang et al., 2006). До настоящего времени не установлена возможность развития рефлекторного бронхоспазма,

опосредованного TRPV4, однако осмотическая и химическая активация каналов, экспрессированных на нервных окончаниях, иннервирующих дыхательные пути, вызывала выделение нейромедиаторов (субстанции P и кальцитонин ген-связанного пептида) и появление признаков нейрогенного воспаления (N. Vergnolle et al., 2010).

Активация TRPV4 на гладкомышечных клетках гипотоническим раствором приводила к сокращению гладкой мускулатуры в изолированном бронхе или трахее (Y. Jia et al., 2004). Тот же результат был получен при активации TRPV4 специфическим агонистом, при этом сокращение полностью подавлялось антагонистом TRPV4 и не зависело от наличия иннервации (S.J. Bonvini et al., 2013). Установлено, что активация TRPV4 приводит к сокращению гладкой мускулатуры опосредованно, через высвобождение цистеиновых лейкотриенов, обладающих бронхоконстрикторным эффектом (M.A. McAlexander et al., 2014).

Дальнейшие исследования показали, что необходимым условием для этого является ко-локализация гладких миоцитов и тучных клеток, экспрессирующих P2X4 пуринорецепторы. Активация TRPV4 на гладкомышечных клетках сопровождалась выделением АТФ, который, в свою очередь, стимулировал высвобождение лейкотриенов тучными клетками (S.J. Bonvini et al., 2016). Немаловажно, что TRPV4 вовлечены также в пролиферацию гладкомышечных клеток дыхательных путей и дифференцировку фибробластов – существенный компонент ремоделирования с формированием необратимой бронхиальной обструкции. Активация TRPV4 и нисходящего сигнального каскада Ca^{2+} /кальциневрин приводила к ядерной транслокации фактора транскрипции NFATc3 с последующей активацией пролиферации гладкой мускулатуры (L. Zhao et al., 2014). О роли TRPV4 в фиброгенезе свидетельствуют данные о повышенной экспрессии канала в фибробластах больных с идиопатическим легочным фиброзом. Подавление экспрессии TRPV4 приводило к угнетению TGF-1 β -опосредованной дифференцировки миофибробластов, что предотвращало развитие фиброза (S.O. Rahaman et al., 2014).

На реснитчатом эпителии TRPV4, по-видимому, вовлечен в регуляцию работы цилиарного аппарата клетки. Под действием термического или химического раздражителя происходило увеличение частоты биения ресничек, что благоприятствовало мукоцилиарному транспорту (I.M. Lorenzo et al., 2008).

Среди клеток иммунной системы TRPV4 был обнаружен на макрофагах и тучных клетках (К. Hamaoka et al., 2010; D. Zhang et al., 2012). На макрофагах его активация сопровождалась повышенной продукцией супероксид-анионов и оксида азота. Авторами был сделан вывод о важности данной реакции при механическом вентилятор-индуцированном повреждении легкого, поскольку у мышей, нокаутных по гену *TRPV4*, подобная реакция макрофагов отсутствовала.

Среди прочих TRPV-каналов, каналу TRPV2 исследователями уделяется относительно меньше внимания, по этой причине имеющиеся в настоящее время данные о его функциональной роли ограничены. В отличие от TRPV1, преобладающего в интраэпителиальных нервных окончаниях, экспрессирующие TRPV2 нервные окончания расположены преимущественно в подслизистом слое трахеи. Кроме этого, канал был найден в нервных клетках ганглиев перитрахеального сплетения. Однако, по всей видимости, TRPV2 не способен опосредовать нейрогенное воспаление, поскольку не экспрессируется совместно с субстанцией P или кальцитонин-ген связанным пептидом (Y. Yamamoto et al., 2007).

TRPV2 широко экспрессирован в клетках иммунной системы. Установлено, что TRPV2 играет ключевую роль в процессе фагоцитоза, включая его ранние стадии. Макрофаги с выключенной экспрессией TRPV2 демонстрировали угнетенную подвижность в присутствии факторов хемотаксиса, а также существенно сниженную способность к первичному связыванию фагоцитируемых частиц и самому фагоцитозу. Мыши, нокаутные по *TRPV2*, имели повышенную восприимчивость к патогенным бактериям и раньше погибали при заражении (T.M. Link et al., 2010). Помимо макрофагов, TRPV2 удалось обнаружить на тучных клетках, где его активация была сопряжена с дегра-

нуляцией (A.J. Stokes et al., 2004; D. Zhang et al., 2012), а также на нейтрофильных гранулоцитах, где катионный канал играет важную роль в процессе клеточной миграции (I. Heiner et al., 2003).

Накоплены данные об экспрессии TRPV2 на лимфоцитах (C.I. Saunders et al., 2007; X. Cai et al., 2013), среди которых TRPV2 обнаруживается преимущественно на NK-клетках, где уровень экспрессии канала в 10-30 раз выше, по сравнению с другими клетками иммунной системы (A.I. Su et al., 2004). TRPV2 экспрессируется также Т- и В-клетками (M.D. Cahalan, K.G. Chandy, 2009; R.S. Boyd et al., 2009). В частности, на Т-лимфоцитах TRPV2 участвует в процессах клеточного сигналинга с участием Т-клеточных рецепторов (TCR), которые нарушаются при выключении гена. Однако при действии агониста TRPV2 в экспериментальных условиях снижалось количество субпопуляций Т-клеток (B. Ignatowska-Jankowska et al., 2009), а также падала продукция некоторых цитокинов и факторов роста (IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , GM-CSF, IFN- γ) у NK-клеток (M.D. Srivastava et al., 1998). У детей, больных бронхиальной астмой, отмечался более высокий уровень экспрессии TRPV2 (X. Cai et al., 2013).

Данные о возможной экспрессии TRPV2 в бронхиальном эпителии отсутствуют, однако рецептор был найден в клетках подслизистых желез трахеи (T. Kowase et al., 2002).

3.4. Полиморфизм генов TRPV1, TRPV2 и TRPV4 и гиперреактивность дыхательных путей в ответ на осмотические стимулы

Несмотря на убедительные доказательства возможной роли TRPV каналов в опосредовании реакций респираторного тракта, исследования функциональной значимости отдельных аллельных вариантов генов *TRPV* при патологии дыхательной системы немногочисленны, а данные в отношении их возможного влияния на реактивность дыхательных путей в ответ на гипо- и гиперосмотические стимулы отсутствуют.

На основании имеющихся данных, можно заключить, что для однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *TRPV1* характерны ассоциации с респираторными симптомами. Для варианта Val ОНП Pе585Val была обнаружена сниженная на 20-30% функциональная активность рецептора, что выражалось в умеренном уменьшении риска наличия свистящих хрипов у детей носителей, больных бронхиальной астмой (G. Cantero-Recasens et al., 2010). Для ОНП 3'-UTR области были найдены ассоциации с бронхиальной астмой в китайской популяции (Q. Wang et al., 2009). Установлено, что некоторые ОНП *TRPV1* связаны с наличием персистирующего кашля (в том числе ночного) при контакте с ирритантами в производственных условиях и сигаретным дымом (L.A. Smit et al., 2012), а также способны оказывать влияние на уровень контроля астмы (С.Е. Deering-Rice et al., 2016).

Среди исследований патофизиологической роли однонуклеотидных полиморфизмов *TRPV4* можно выделить работу W. Tian et al. (2009), демонстрирующую влияние замены Pro19Ser на сывороточную концентрацию натрия – минорный аллель при этом был ассоциирован с гипонатриемией. В исследовании D.M. Duan et al. (2015) обнаруживалось влияние ряда ОНП на индекс массы тела, а ОНП rs10735104 в доминантной модели был ассоциирован с ожирением. G. Zhu et al. (2009) показали, что некоторые ОНП из региона *TRPV4* могут быть ассоциированы с ХОБЛ, а также параметрами функции легких (ОФВ₁, ОФВ₁/ФЖЕЛ). В отличие от ОНП *TRPV1* и *TRPV4*, возможная роль вариаций гена *TRPV2* в формировании респираторной патологии остается неизученной.

Нами был проведен ассоциативный анализ однонуклеотидных полиморфизмов генов *TRPV1*, *TRPV2* и *TRPV4* с гипо- и гиперосмотической гиперреактивностью дыхательных путей среди больных бронхиальной астмой легкой и средней степени тяжести. Количество генотипированных по полиморфизмам гена *TRPV4* составило 198 человек, по полиморфизмам *TRPV1* и *TRPV2* – 169 человек. Среди ОНП *TRPV1* были отобраны 3 миссенс вариации, т.е. ОНП в кодирующих частях гена, влекущие за собой замены в аминокислотной последовательно-

сти белка, и, таким образом, теоретически играющие наибольшее функциональное значение: rs222747 (с.945G>C, Met315Ile), rs224534 (с.1406G>A, Thr469Ile) и rs8065080 (с.1753A>G, Ile585Val). ОНП гена *TRPV2* включали полиморфизм 5' фланкирующей области rs7217735 (g.16412605A>G), ОНП 5'-UTR rs3813769 (с.-323A>G) и синонимичный ОНП кодирующего участка rs1129235 (с.427A>C, Arg143Arg). Для *TRPV4* были изучены два ОНП - rs6606743 в 5' фланкирующей области (g.109841374G>A) и интронный вариант rs7971845 (с.-31-8070G>C).

Генотипирование всех ОНП, кроме rs7217735, проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Использованные праймеры приведены в табл. 13.

Таблица 13. Структура используемых праймеров.

ОНП	Олигонуклеотидные последовательности*
TRPV1 rs222747	FWD 5'-AACACGAAGTTTGTGACGAGCATGT-3'
	REV 5'-CGTCATTCCCTTCTTGTGGTGAG-3'
TRPV1 rs224534	FWD 5'-CAGCCTCCCTTTAAGATGGAAAC <u>CAA</u> -3'
	REV 5'-TCACAATGTGGGAAGGAACGCT-3'
TRPV1 rs8065080	FWD 5'-CCTGTGCCGTTTCATGTT <u>GAT</u> CTAC-3'
	REV 5'-TTCAGAAGGCTCAGCCAAGCAG-3'
TRPV4 rs6606743	FWD 5'-ACAAGAGAGGGTGGCAGTGGGT-3'
	REV 5'-TCTGTCGCCCCCTACTCACAGGAT <u>TC</u> -3'
TRPV4 rs7971845	FWD 5'-ATTGCCTTCCTTGGTCCTCAGT-3'
	REV 5'-CAGTCAAGCATGGCTGCTGTT-3'
TRPV2 rs3813769	FWD 5'-CAGATGGTCAGTCTCTGGTGGCTA-3'
	REV 5'-AGCAGGTTCTGGTCTCTCGGTC-3'
TRPV2 rs1129235	FWD 5'-TCTTCCCACAGAGGGCTCCACAG-3'
	REV 5'-ATCCAAGAAAGGCTCACTCACCG-3'
TRPV2 rs7217735	FWD 5'-AGCCTTCTTGAGCACCCTT-3'
	REV 5'-ACTCCCAGAGCAACCTTATTTAC-3'
	Probe 5'-GATCTCACCCCTTGGAAAGTATGGTGGTAA-3'

* подчеркнутые нуклеотиды изменены для введения сайта рестрикции.

Смесь для ПЦР включала в себя: ДНК-матрица 100 нг, 1х ПЦР-буфер, содержащий Sybr Green I, $MgCl_2$ 3 мМ, dNTP 0,2 мМ, праймеры – по 0,2 мкМ каждого, Hot Start Taq-полимераза, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 12,5 мкл. Амплификация проводилась в режиме: предварительная денатурация – $95^\circ C/2,5$ мин., 35 циклов – денатурация $95^\circ C/20$ сек., отжиг при $62^\circ C/30$ сек., элонгация $72^\circ C/30$ сек., финальная элонгация - $72^\circ C/5$ мин. Для ОНП rs6606743 и rs7971845 температура отжига составляла $60^\circ C$ и $64^\circ C$, соответственно.

Генотипирование ОНП *TRPV2*: rs7217735 проводилось методом асимметричной ПЦР с анализом плавления немеченого олигонуклеотидного зонда. Смесь для ПЦР включала в себя: ДНК-матрица 100 нг, 1х ПЦР-буфер, содержащий EvaGreen, $MgCl_2$ 2,5 мМ, dNTP 0,25 мМ, праймеры – обратный - 0,12 мкМ, прямой - 0,02 мкМ, немеченный зонд – 0,12 мкМ, Hot Start Taq-полимераза, ингибированная антителами – 1 ЕД, вода – до 25 мкл. Амплификация проводилась в режиме: предварительная денатурация – $95^\circ C/2,5$ мин., 70 циклов – денатурация $95^\circ C/20$ сек., отжиг при $60^\circ C/30$ сек., элонгация $72^\circ C/30$ сек., финальная элонгация - $72^\circ C/5$ мин. Анализ плавления: предварительная денатурация при $95^\circ C/3$ мин., гибридизация - $40^\circ C/3$ мин., плавление с градиентным повышением температуры от $40^\circ C$ до $90^\circ C$ с шагом $0,5^\circ C/0,2$ мин. При наличии аллеля А на кривой плавления фиксировался пик с $T_m=67^\circ C$, аллеля G - с $T_m=62,5^\circ C$, при гетерозиготном состоянии – оба указанных пика.

Для ОНП, определяемых с помощью ПЦР- полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, проводилась обработка амплификата эндонуклеазами рестрикции. Рестрикцию ПЦР продукта однонуклеотидных полиморфизмов rs224534 (Thr469Ile) длиной 121 п.н. осуществляли инкубацией с 5 ЕД рестриктазы *MfeI* при $37^\circ C$ в течение 16 часов. При наличии аллеля А (вариант Ile469) продукт разрезался на фрагменты 23 и 98 п.н.

Рестрикцию ПЦР продукта ОНП rs8065080 (Ile585Val) длиной 113 п.н. осуществляли инкубацией с 5 ЕД рестриктазы *Bse8I* при $60^\circ C$

в течение 16 часов. При наличии аллеля А (вариант *Pe585*) продукт разрезался на фрагменты 23 и 90 п.н.

Рестрикцию ПЦР продукта ОНП rs222747 (*Met315Ile*) длиной 105 п.н. осуществляли инкубацией с 5 ЕД рестриктазы *Bse8I* при 60°C в течение 16 часов. При наличии аллеля С продукт разрезался на фрагменты 37 и 68 п.н.

Рестрикцию ПЦР продукта ОНП rs3813769 (с.-323A>G) длиной 115 п.н. осуществляли инкубацией с 5 ЕД рестриктазы *AccBSI* при 37°C в течение 16 часов. При наличии аллеля G продукт разрезался на фрагменты 56 и 59 п.н.

Рестрикцию ПЦР продукта однонуклеотидного полиморфизма rs1129235 (с.427A>C) длиной 323 п.н. осуществляли инкубацией с 5 ЕД рестриктазы *AsuC2I* при 37°C в течение 16 часов. При наличии аллеля С продукт разрезался на фрагменты 147, 104 и 72 п.н., аллеля А – 251 и 72 п.н. Таким образом, продукт содержал два сайта рестрикции, один из которых служил для внутреннего контроля работы фермента в каждом образце.

Рестрикцию ПЦР продукта длиной ОНП rs6606743 длиной 114 п.н. осуществляли инкубацией с 10 ед. рестриктазы *TaqI* при 37°C в течение 16 часов. Продукт разрезался рестриктазой при наличии аллеля G на два фрагмента 90 и 24 п.н.

Рестрикцию ПЦР продукта ОНП rs7971845 длиной 104 п.н. осуществляли 10 ед. рестриктазы *HinfI* инкубацией при 37°C в течение 16 часов. Продукт разрезался рестриктазой при наличии аллеля С на два фрагмента 80 и 24 п.н. Детекцию продуктов амплификации и рестрикции для всех исследованных полиморфизмов проводили методом электрофореза в 4% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием.

Частоты генотипов для всех генотипированных однонуклеотидных полиморфизмов не демонстрировали значимого отклонения от равновесия Харди-Вайнберга, однако, для ряда ОНП фиксировались существенные отличия от частот, приведенных в базе *НарМар* для европейской популяции (табл. 14).

Таблица 14. Частоты генотипов и аллелей генотипированных ОНП.

ОНП	Гено-тип/аллель	Наблюдаемая частота	Частота для европейцев	P_{H-W} (отклонение от ожидаемой частоты)
TRPV1 rs222747	CC	46,2%	66,7%	0,2
	CG	46,2%	30%	
	GG	7,2%	3,3%	
	C	69,6%	81,7%	
	G	30,4%	18,3%	
TRPV1 rs224534	AA	13,4%	11,6%	0,3
	AG	52,1%	43,8%	
	GG	34,5%	44,6%	
	A	39,5%	33,5%	
	G	60,5%	66,5%	
TRPV1 rs8065080	AA	32,1%	39,8%	0,65
	AG	50,6%	48,7%	
	GG	17,3%	11,5%	
	A	57,4%	64,2%	
	G	42,6%	35,8%	
TRPV2 rs7217735	AA	59,5%	44,2%	0,85
	AG	35,6%	46,9%	
	GG	4,9%	8,9%	
	A	77,3%	67,7%	
	G	22,7%	32,3%	
TRPV2 rs3813769	AA	51,8%	40,7%	0,45
	AG	38,7%	48,7%	
	GG	9,5%	10,6%	
	A	71%	65%	
	G	29%	35%	
TRPV2 rs1129235	AA	30,3%	43,8%	0,68
	AC	50,9%	45,5%	
	CC	18,8%	10,7%	
	A	55,8%	66,5%	
	C	44,2%	33,5%	
TRPV4 rs6606743	AA	21,2%	22%	0,67
	AG	51,3%	40,7%	
	GG	27,5%	37,3%	
	A	46,8%	42,4%	
	G	53,2%	57,6%	
TRPV4 rs7971845	CC	61,4%	60,2%	0,48
	CG	38,8%	33,6%	
	GG	5,8%	6,2%	
	C	77,8%	77%	
	G	22,2%	23%	

Среди ОНП гена *TRPV4* при анализе ассоциаций с реакцией на бронхопровокационную пробу с дистиллированной водой значимые результаты были получены для ОНП rs6606743 (табл. 15). В группе больных с осмотической гиперреактивностью отмечалась большая частота генотипов AG и GG. В это же время генотип AA, напротив, чаще встречался среди лиц с неизменной реактивностью на гипоосмотический стимул. Анализ частоты аллелей показал, что аллель G ассоциирован с положительной реакцией на осмотическую бронхопровокацию, а аллель A, соответственно, преобладал среди лиц без осмотической гиперреактивности дыхательных путей. Отношение шансов (ОШ) для аллелей составило 1,58 95%ДИ (1,04–2,40). Анализ в рамках доминантной модели (генотип AA против AG+GG) показал существенное преобладание частоты генотипов AG+GG в группе астматиков с осмотической гиперреактивностью по сравнению с больными с отрицательной реакцией на бронхопровокацию: ОШ 3,31, 95%ДИ (1,07–10,25). Аддитивная модель для ОНП rs6606743 была незначима, хотя и отмечался тренд увеличения отношения шансов при увеличении количества аллелей G в генотипе.

Таблица 15. Частоты генотипов и аллелей ОНП rs6606743 в группах с наличием и отсутствием гипоосмотической гиперреактивности дыхательных путей (ГДП) при оценке различных моделей наследования.

Группы	Генотипы/аллели, % (n)			p
Общая модель наследования				
Группа с ГДП	AA 13,3%	AG 53,3%	GG 33,3%	0,07
Группа без ГДП	AA 26,3%	AG 50%	GG 23,7%	
Доминантная модель наследования				
Группа с ГДП	AA 13,3%	AG + GG 86,7%		0,03
Группа без ГДП	AA 26,3%	AG + GG 73,7%		
Мультипликативная модель наследования (аллели)				
Группа с ГДП	A 40%	G 60%		0,03
Группа без ГДП	A 51,3%	G 48,7%		

При оценке изменений со стороны функции легких в ответ на бронхопровокационную пробу было обнаружено, что носители генотипа *AG* или *GG* имели более выраженную реакцию по сравнению с гомозиготами *AA*. Среди лиц, имевших аллель *G* в генотипе, отмечалось заметное снижение основных спирометрических показателей через минуту после гипоосмотической бронхопровокации (рис. 19).

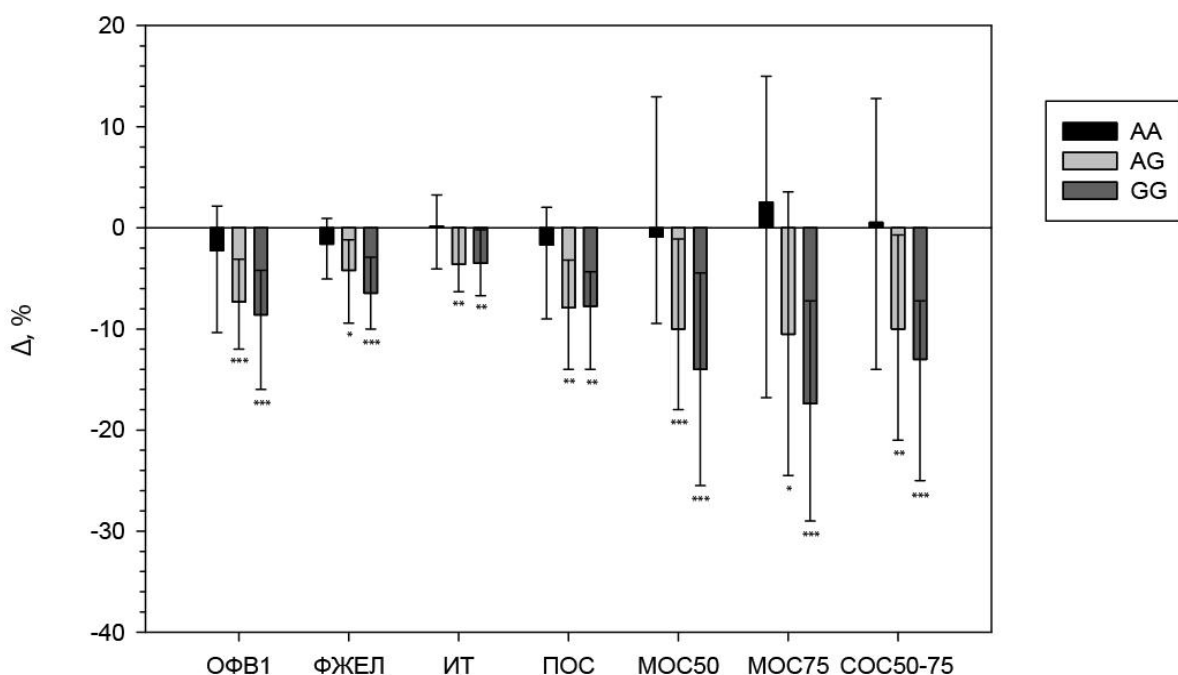


Рис. 19. Изменение параметров функции внешнего дыхания в ответ на бронхопровокационную пробу с 3-минутной ингаляцией дистиллированной воды у больных бронхиальной астмой - носителей различных генотипов по ОНП rs6606743 гена *TRPV4*. Значимость различий для генотипов *AG* и *GG* указана при сравнении с генотипом *AA*: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$.

Так, для параметра Δ ОФВ₁, который является ключевым для оценки наличия гиперреактивности дыхательных путей, значения составляли -2,25 (-10,3; 2,16), -7,3 (-12,0; -3,1) и -8,6 (-16,0; -4,2) для генотипов *AA*, *AG* и *GG*, соответственно. При анализе генотипов ОНП rs7971845 в доминантной модели была обнаружена сравнительно высокая частота встречаемости носительства вариантов *CC* + *GC* в группе больных с осмотической гиперреактивностью дыхательных путей, однако отноше-

ние шансов для данных генотипов было незначимо (7,12 95%ДИ (0,89; 56,79)) (табл. 16).

Таблица 16. Частоты генотипов и аллелей ОНП rs7971845 в группах с наличием и отсутствием гипоосмотической гиперреактивности дыхательных путей (ГДП) при оценке различных моделей наследования.

Группы	Генотипы и аллели, % (n)			p
Общая модель наследования				
Группа с ГДП	CC 64%	CG 34,7%	GG 1,3%	0,10
Группа без ГДП	CC 59,7%	CG 31,6%	GG 8,7%	
Доминантная модель наследования				
Группа с ГДП	CC + CG 98,7%		GG 1,3%	0,03
Группа без ГДП	CC + CG 91,2%		GG 8,8%	
Мультипликативная модель наследования (аллели)				
Группа с ГДП	C 81,3%	G 18,7%	0,18	
Группа без ГДП	C 75,4%	G 24,6%		

Носители аллеля *C* (генотипы *CC* и *GC*) демонстрировали более выраженные изменения проходимости дыхательных путей в ответ на бронхопровокационную пробу с 3-минутной ингаляцией дистиллированной воды ($\Delta\text{ОФВ}_1$ -7,25 (-14; -2,7) и -7,7 (-12; -2,8), соответственно), в то время как генотип *GG* был ассоциирован лишь с незначительной реакцией ($\Delta\text{ОФВ}_1$ -2,4 (-5,6; 3,7)). Уровень значимости при сравнении $\Delta\text{ОФВ}_1$ у носителей гомозиготных генотипов составил 0,03, прочих различий не обнаружено.

Кроме вариаций *TRPV4*, которые, как было показано, способны влиять на формирование гиперреактивности дыхательных путей на гипоосмотический стимул, с данным феноменом оказались ассоциированы также ОНП гена *TRPV2*. Среди них взаимосвязь с гиперреактивностью была найдена для rs3813769 и rs1129235. В первом случае, генотип *AA* чаще встречался среди больных с положительной реакци-

ей на бронхопровокацию ИДВ, тогда как генотип *GG* регистрировался исключительно среди больных с неизменной осмотической реактивностью. Доля лиц с гетерозиготных генотипов при этом практически не отличалась между группами. Ассоциация была более значима в доминантной модели наследования, при этом все больные с гипоосмотической гиперреактивностью имели аллель *A* в генотипе (генотипы *AA* и *AG*). При анализе частоты аллелей также обнаруживались результаты, указывающие на взаимосвязь варианта *A* с гипоосмотической гиперреактивностью дыхательных путей. Носительство данного аллеля увеличивало шанс наличия гиперреактивности в 2 раза, 95%ДИ (1,08-3,72) (табл. 17).

Таблица 17. Частоты генотипов и аллелей ОНП rs3813769 в группах с наличием и отсутствием гипоосмотической гиперреактивности дыхательных путей при оценке различных моделей наследования.

Группы	Генотипы/аллели, %			р
Общая модель наследования				
Группа с ГДП	<i>AA</i> 61,9%	<i>AG</i> 38,1%	<i>GG</i> 0%	0,04
Группа без ГДП	<i>AA</i> 49,5%	<i>AG</i> 36,9%	<i>GG</i> 13,6%	
Доминантная модель наследования				
Группа с ГДП	<i>AA + AG</i> 100%		<i>GG</i> 0%	0,01
Группа без ГДП	<i>AA + AG</i> 86,4%		<i>GG</i> 13,6%	
Мультипликативная модель наследования (аллели)				
Группа с ГДП	<i>A</i> 81%	<i>G</i> 19%	0,03	
Группа без ГДП	<i>A</i> 68%	<i>G</i> 32%		

Несмотря на качественную ассоциацию с признаком, нам не удалось зафиксировать значимых различий в реакции показателей функции внешнего дыхания в ответ на бронхопровокационную пробу. Тем не менее, можно отметить тенденцию к более выраженной реак-

ции среди *AA* гомозиготных больных, и наименьшему снижению показателей в случае носительства генотипа *GG* (рис. 20).

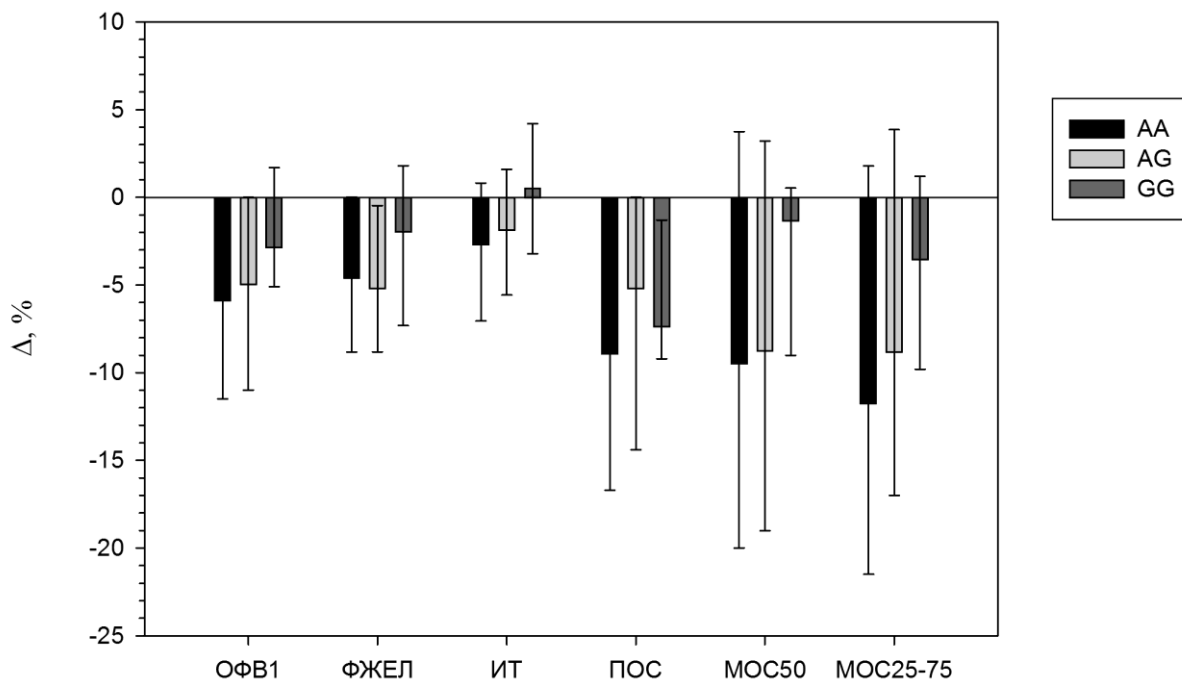


Рис. 20. Изменение параметров функции внешнего дыхания в ответ на бронхопровокационную пробу с 3-минутной ингаляцией дистиллированной воды у больных бронхиальной астмой - носителей различных генотипов по ОНП rs3813769 гена *TRPV2*.

Для ОНП rs1129235 выявленная ассоциация с гиперреактивностью дыхательных путей на осмотический стимул оказалась наиболее сильной. Больные с генотипом *CC* чаще встречались среди лиц с гипоосмотической гиперреактивностью дыхательных путей, а носительство *AA* гомозиготного генотипа отмечалось преимущественно среди лиц без гиперреактивности. Различия в частоте генотипов были значимы также в аддитивной и рецессивной модели, где генотип *CC* увеличивал шанс формирования гипоосмотически-индуцированного бронхоспазма в 4,15 раза (95%ДИ (1,75-9,86)).

Анализ распределения частоты аллелей подтверждал сделанный вывод о патогенной значимости аллеля *C* (ОШ 2,13 95%ДИ (1,26-3,6) (табл. 18).

Таблица 18. Частоты генотипов и аллелей ОНП rs1129235 в группах с наличием и отсутствием гипоосмотической гиперреактивности дыхательных путей при оценке различных моделей наследования.

Группы	Генотипы/аллели, %			р
Общая модель наследования				
Группа с ГДП	АА 22,5%	АС 40%	СС 37,5%	0,003
Группа без ГДП	АА 35%	АС 52,4%	СС 12,6%	
Рецессивная модель наследования				
Группа с ГДП	АА + АС 62,5%		СС 37,5%	<0,001
Группа без ГДП	АА + АС 87,4%		СС 12,6%	
Мультипликативная модель наследования (аллели)				
Группа с ГДП	А 42,5%	С 57,5%		0,004
Группа без ГДП	А 61,2%	С 38,8%		

В отличие от ОНП rs3813769, различия в реакции показателей функции внешнего дыхания для различных генотипов ОНП rs1129235 были значительными (рис. 21). В случае генотипа СС отмечалось существенное снижение параметров в ответ на ингаляцию аэрозоля дистиллированной воды, тогда как реакция у носителей генотипов АА и АС была в пределах нормы и практически не отличалась между данными вариантами.

Между ОНП rs3813769 и rs1129235 было зафиксировано умеренное неравновесие по сцеплению ($D' = 0,46$). Анализ гаплотипов показал, что среди четырех возможных вариантов гаплотип А/С, состоящий из аллелей риска, и имевший наибольшую частоту в исследованной выборке больных, был в большей степени представлен среди больных с гипоосмотической гиперреактивностью (табл. 19). По сравнению с ним, гаплотипы А/А и G/A были ассоциированы со сниженным шансом формирования гипоосмотической гиперреактивно-

сти, а гаплотип G/C не демонстрировал достоверных различий, что также косвенно подтверждает относительное преобладание функционального эффекта ОНП rs1129235 над rs3813769.

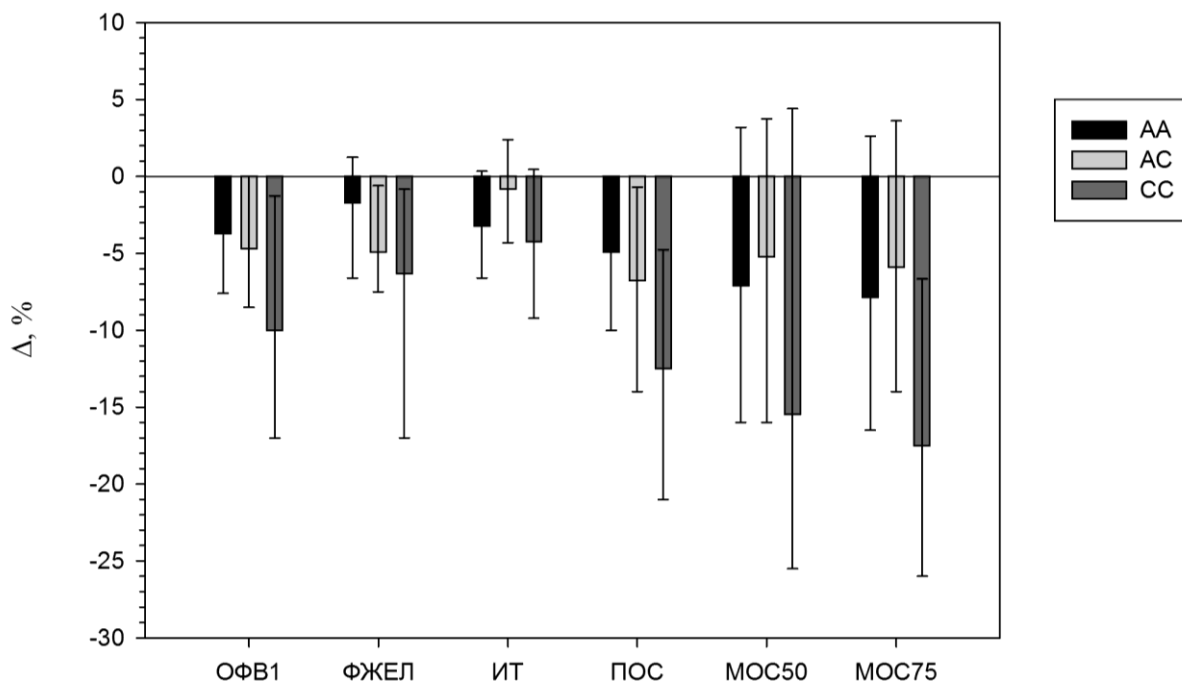


Рис. 21. Изменение параметров функции внешнего дыхания в ответ на бронхопровокационную пробу с 3-минутной ингаляцией дистиллированной воды у больных бронхиальной астмой - носителей различных генотипов по ОНП rs1129235 гена *TRPV2*. Значимость различий для генотипов AA и AC указана при сравнении с генотипом CC: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$.

Таблица 19. Частоты гаплотипов для ОНП гена *TRPV2* в группах с наличием и отсутствием гипоосмотической гиперреактивности дыхательных путей и их влияние на гипоосмотическую гиперреактивность дыхательных путей.

rs3813769	rs1129235	Частота в общей выборке	Частота в группе с ГДП	Частота в группе без ГДП	ОШ	p
A	C	37,4%	52,8%	31,0%	-	-
A	A	34,4%	28,9%	37,0%	0,44 (0,23-0,85)	0,017
G	A	21,4%	13,4%	24,2%	0,33 (0,15-0,72)	0,006
G	C	6,8%	4,9%	7,8%	0,33 (0,08-1,45)	0,14

Среди изученных ОНП нам не удалось установить ни одного, оказывающего влияние на гиперреактивность дыхательных путей в ответ на гиперосмолярность, возникающую при ингаляции аэрозоля гипертонического раствора хлорида натрия. Это может свидетельствовать о необходимости дальнейшего расширения спектра изучаемых ОНП, прежде всего гена *TRPV1*, кодирующего соответствующие рецепторы, чувствительные к повышению осмотического давления. Другим объяснением может оказаться несущественная роль *TRPV1* в механизмах развития гиперосмотически-индуцированного бронхоспазма.

В отношении гиперреактивности дыхательных путей в ответ на дозированную физическую нагрузку обнаруживалась тенденция к взаимосвязи с ОНП rs222747 гена *TRPV1*. Носители генотипа *GG* встречались преимущественно среди больных с положительной реакцией на пробу, а *CC* гомозиготы преобладали в группе без постнагрузочного бронхоспазма (табл. 20).

Таблица 20. Частоты генотипов и аллелей ОНП rs222747 в группах с наличием и отсутствием постнагрузочного бронхоспазма при оценке различных моделей наследования.

Группы	Генотипы/аллели, %			р
Общая модель наследования				
Группа с ГДП	CC 36,4%	CG 40,9%	GG 22,7%	0,07
Группа без ГДП	CC 49,4%	CG 43,8%	GG 6,7%	
Рецессивная модель наследования				
Группа с ГДП	CC + CG 77,3%		GG 22,7%	0,02
Группа без ГДП	CC + CG 93,3%		GG 6,7%	
Мультипликативная модель наследования (аллели)				
Группа с ГДП	C 56,8%		G 43,2%	0,06
Группа без ГДП	C 71,3%		G 28,7%	

Однако вследствие небольшой частоты выявления последнего (около 20%), необходимо дальнейшее увеличение размеров выборки для получения однозначных результатов относительно патологического эффекта данного генетического варианта. Каких-либо ассоциаций между генотипами и выраженностью снижения параметров функции внешнего дыхания установить не удалось.

Таким образом, у больных бронхиальной астмой нами были обнаружены три ОНП, в том числе один ОНП гена *TRPV4* и два ОНП *TRPV2*, ассоциированные с предрасположенностью к формированию бронхоспазма при вдыхании влажного воздуха. Это может свидетельствовать о важной роли данных катионных каналов в этиопатогенезе гипоосмотической гиперреактивности дыхательных путей, и являться обоснованием для их дальнейшего изучения в качестве мишеней фармакотерапии.

ГЛАВА 4. КЛЕТОЧНЫЕ ПАТТЕРНЫ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОСМОТИЧЕСКОЙ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Бронхиальная астма рассматривается в настоящее время как хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей (Г.Б. Федосеев и др., 2015; GINA, 2016). Как всякое воспаление, являющееся генетически запрограммированной реакцией организма на тканевое повреждение, воспалительный процесс при астме, несмотря на универсальность основополагающих механизмов, в каждом конкретном случае обладает уникальностью физиологических и структурных проявлений (Г.Б. Федосеев и др., 2015). Индивидуальные особенности воспаления находят отражение в гетерогенности морфологических признаков. У больных бронхиальной астмой гетерогенность воспаления, определяемая степенью выраженности патогномоничного для астмы Th2-воспалительного ответа и наличием иммунных реакций Th1 типа, манифестируется различными фенотипами (Г.Б. Федосеев и др., 2015; J.L. Simpson et al., 2006; S. Wenzel, 2012; P. Nair, 2013; N.R. Mohamed et al., 2014), которые проявляются воспалительно-клеточными паттернами, структурирующими различные типы гиперреактивности бронхов.

Фенотипирование воспаления позволяет охарактеризовать патогенез и, тем самым, выделить эндотип бронхиальной астмы, а также прогнозировать динамику заболевания и реакцию на лечение (Г.Б. Федосеев и др., 2015; R.H. Green et al., 2002; J.L. Simpson et al., 2006). Практическое значение для фенотипирования приобретает цитологический метод исследования мокроты больных бронхиальной астмой с подсчетом процентного содержания клеток и созданием цитограммы.

Для клинической диагностики предложены следующие клеточ-

ные фенотипы цитограмм: эозинофильный ($\geq 2\%$ эозинофилов), нейтрофильный ($\geq 61\%$ нейтрофилов), смешанный, неэозинофильный (эозинофилы $< 2\%$), ненейтрофильный (малогранулоцитарный, нейтрофилы $< 2\%$) (Г.Б. Федосеев и др., 2015). Эозинофильный фенотип цитограммы ассоциируется с атопическим фенотипом бронхиальной астмы, Th2 иммунным ответом, положительной реакцией на лечение ингаляционными глюкокортикостероидами (иГКС) и препаратами антиинтерлейкина (анти-IL)-5 (Г.Б. Федосеев и др., 2015; M. Berry et al., 2007; P. Nair, 2013).

Нейтрофильный фенотип мокроты индуцируется вирусной и бактериальной инфекцией, активизирующей Th1 тип иммунного воспалительного ответа (P.A.V. Wark et al., 2002; Q. Zhang et al., 2012). Рядом авторов у 63,8% больных бронхиальной астмой обнаружен эозинофильный фенотип воспаления, у 10% – нейтрофильный, у 10% – смешанный, у 26,2% зарегистрирован малогранулоцитарный фенотип воспаления (Г.Б. Федосеев и др., 2015; N.R. Mohamed et al., 2014).

Климатические условия Дальнего Востока, связанные с резкой сменой сезонов, неблагоприятными экологическими факторами, воздействием холодного, влажного, загрязненного атмосферного воздуха обуславливают высокий риск дизадаптации дыхательной системы и респираторных инфекций, способствуют развитию у астматиков холодовой и осмотической гиперреактивности бронхов, а также, несомненно, нестабильности воспалительных паттернов, включенных в архитектуру фенотипа.

Доказано, что холодиндуцированный и осмоиндуцированный виды бронхиальной гиперреактивности имеют схожий молекулярно-генетический механизм развития, в основе которого находится опосредующее осмо- и терморцепцию семейство ионных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP): TRPM8, TRPV1, TRPV2 и TRPV4 (А.Г. Приходько и соавт., 2014; Д.Е. Наумов и др., 2016; D.E. Naumov et al., 2015). TRP-рецепторы, экспрессированные на эпителиальных и соединительнотканых клетках респираторного тракта, при активации обуславливают синтез и секрецию воспали-

тельных медиаторов, гиперсекрецию муцинов, сокращение бронхиальных лейомиоцитов (Д.Е. Наумов и др., 2016; L. Alenmyr et al., 2011; M.C. Li et al., 2011; D.E. Naumov et al., 2015). Таким образом, создается платформа для персистирующего воспаления, зависящего от общебиологических провоспалительных эффектов, отвечающих за генезис единого генетически предопределенного воспалительного фенотипа.

Нерешенной остается проблема реализации таких детерминаций на уровне паттернов бронхиального воспаления у больных бронхиальной астмой с холодовой и осмотической гиперреактивностью дыхательных путей, исходя из представления об участии паттернов в формировании воспалительного фенотипа.

С целью получения сведений о тех воспалительных паттернах, которые развиваются в бронхах при бронхиальной астме в ответ на воздействие холодового и осмотического триггеров и лежат в основе такой подвижной конструкции, как фенотип воспаления, цитологический метод исследования индуцированной мокроты (ИМ), хорошо известный и распространенный в клинической практике, был дополнен нами методом цитохимии.

Индуцированная мокрота для цитологического исследования бралась не позднее 2 часов после ее получения. В камере Горяева оценивалось количество клеток в единице нативного материала индуцированной мокроты стандартным методом. Для уточнения клеточного состава 50 мкл ИМ наносили на предметные стекла, нагретые до температуры 37° С. Мазки изготавливались стандартным методом Кост и высушивались на воздухе в течение 5-10 минут при температуре 37°С путем помещения в вентилируемый термостат ТМ-2. После фиксации на протяжении 10 минут в парах 40%-го раствора формалина мазки окрашивались в 4-5%-м водном красителе Романовского-Гимза при рН 6,8. Исследование микропрепаратов ИМ проводили по общепринятой методике (R. Djukanovic et al., 2002) 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) (R. Djukanovic et al., 2002). Подсчитанное количество нейтрофильных лейкоцитов, эозинофильных лейкоцитов, макрофагов, лимфоцитов и клеток бронхиального эпителия выражали в процентах.

Цитохимический метод использовали для определения в мазках ИМ активности миелопероксидазы (МПО) нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов. Для этого применялся метод Грэхема-Кнолля (Ф.Г.Дж. Хейхоу, Д. Кваглино, 1983) с докраской мазков после обработки бензидином и перекисью водорода водным раствором азура-2. Изображения микропрепаратов переводили в цифровую форму с помощью цифровой видеокамеры ДСМ 510 с системой захвата изображения. Для цифровой обработки изображений клеток использовали компьютерные программы Image Tool и Optika Vision Pro (Италия), Mac Biophotonics Image S (США). На основании полученных данных 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 (1993). 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 изменений структурной целостности клеточных элементов. Степень повреждения клеток вычисляли с помощью суммарного индекса деструкции клеток (ИДК):

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

Индекс интенсивности цитолиза (ИЦ) рассчитывали как отношение наиболее разрушенных клеток к содержанию остальных поврежденных клеток:

$$ИЦ = \frac{n_4}{n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4},$$

где 0, 1, 2, 3, 4 – номера классов деструкции; n_0, n_1, n_2, n_3, n_4 – количество клеток соответствующего класса.

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

Сочетание цитологического и цитохимического методов исследования мокроты обеспечивает наиболее точную оценку морфофункционального профиля воспалительного инфильтрата пациентов при каждом отдельном виде бронхиальной гиперреактивности, предоставляя возможность акцентировать внимание на ведущих эффекторах воспаления – эозинофильных и нейтрофильных лейкоцитах, их количественных соотношениях и функции.

Анализ цитограмм ИМ позволил выявить общую закономерность для воспалительных паттернов больных бронхиальной астмой с чрезмерной реакцией дыхательных путей на холодовой и осмотический стимулы. Такой закономерностью является включение в структуру цитограммы эозинофильного фенотипа воспаления значительно нейтрофильного компонента, представляющего, наряду с эозинофилами, популяцию гранулоцитов (табл. 21-23).

Таблица 21. Клеточный состав (%) индуцированной мокроты, интенсивность цитолиза (ИДК/ИЦ) и средний цитохимический коэффициент (СЦК) МПО (пиксели) эозинофилов и нейтрофилов у больных с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей.

Показатели	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты	Эпителий
Количество	26,4±1,7	18,5±2,6	49,5±3,2	3,4±0,4	2,0±0,16
ИДК/ИЦ	0,61±0,05	0,60±0,10			
СЦК МПО	65,9±5,4				

Количество нейтрофильных лейкоцитов в воспалительно-клеточном паттерне бронхов, реагирующих на холодовой и осмотический стимулы, связано, по всей вероятности, с необходимостью продукции и резервирования в их цитоплазме МПО, протеинов и других

провоспалительных медиаторов. Чем больше нейтрофилов в бронхиальном инфилtrate и чем выше их функциональная активность, тем сильнее стимул для процессов возбуждения и чувствительности к холодовому и осмотическим стимулам клеток-мишеней.

Таблица 22. Клеточный состав (%) индуцированной мокроты, показатели интенсивности цитолиза (ИДК/ИЦ) и деструкции клеток (ИДК), средний цитохимический коэффициент (СЦК) МПО (пиксели) эозинофилов и нейтрофилов у больных с гиперреактивностью дыхательных путей к гипоосмолярному стимулу.

Показатели	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты	Эпителий
Количество	22,9±5,2	20,9±3,1	54,4±3,3	2,5±0,4	2,0±0,4
ИДК/ИЦ	0,81±0,04	0,69±0,04			
ИДК	0,55±0,05	0,40±0,06			
СЦК МПО	67,7±4,29				

Таблица 23. Клеточный состав (%) индуцированной мокроты, показатели интенсивности цитолиза (ИДК/ИЦ) и деструкции клеток (ИДК), средний цитохимический коэффициент (СЦК) МПО (пиксели) эозинофилов и нейтрофилов у больных с гиперреактивностью дыхательных путей к гиперосмолярному стимулу.

Показатели	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты	Эпителий
Количество	40,2±4,3	30,5±4,0	54,4±3,3	2,3±0,5	1,3±0,4
ИДК/ИЦ	0,44±0,02	0,34±0,03			
ИДК	0,41±0,02	0,42±0,02			
СЦК МПО	148,4±7,1				

В связи с установленной существенной долей нейтрофилов возникает вопрос о праймирующих (англ. *priming* – подготовка) агентах, определяющих базовый вклад нейтрофилов в воспаление благодаря стимуляции их функциональной активности. Как утверждает А.Н. Маянский (2007), оксидантные реакции нейтрофилов, в первую очередь отвечающие на действие экзогенных и эндогенных триггеров респираторным взрывом, зависят от стимула и могут подвергаться де-

активации или праймированию, т.е. негативному и позитивному кондиционированию.

По А.Н. Маянскому (2007), праймирование наблюдается при контакте нейтрофилов с цитокинами, ростовыми факторами, хемокинами, липидными медиаторами, бактериальными полисахаридами. Нами показана регуляция клеточного воспаления у больных бронхиальной астмой с разными видами бронхиальной гиперреактивности антагонистическими и синергическими взаимоотношениями цитокинов Th2 и Th1 типов. Поддержание числа нейтрофилов обусловлено цитокинами Th1 типа, продукция которых потенцируется МПО и другими окислительными ферментами.

Цитокины Th1 типа стимулируют рост и дифференцировку ранних и поздних гранулоцитарных предшественников и формирование нейтрофильных колоний в культуре кроветворных клеток, способствуют мобилизации нейтрофилов из костного мозга, тем самым увеличивая пул циркулирующих нейтрофилов и миграцию лейкоцитов в очаг воспаления (В.Н. Титов, 2003). На количественную и функциональную характеристики нейтрофилов также воздействует их способность к продукции «самостимулирующих» цитокинов, потенцирующих максимальное раскрытие эффекторных возможностей клеток (А.Н. Маянский, 2007). Данное обстоятельство соответствует представлению о неблагоприятном для прогноза астмы повышении уровня нейтрофилов в мокроте.

Одним из важнейших механизмов стимуляции респираторного взрыва выступает фосфорилирование оксидазных компонентов нейтрофилов и активация киназ и гуанозинтрифосфатаз, ответственных за данный процесс (А.Н. Маянский, 2007). Путем фосфорилирования p47phox и повышения экспрессии флавоцитохрома b558 нейтрофилы преактивируются провоспалительными праймирующими агентами TNF- α , GM-CSF и IL-18 (С. Dewas et al., 2003; С. Elbim et al., 2005). В сборке, обеспечивающей образование активных форм кислорода и свободных радикалов NADPH-оксидазы, по всей вероятности, участвуют и другие цитокины – IL-1, IL-6, IL-8, увеличение

содержания которых, параллельно с увеличенными концентрациями TNF- α , IL-5, IL-10 и ростом количества нейтрофилов, отмечается в дыхательных путях в ответ на действие холодого триггера *in vitro* (M.S. Davis et al., 2007). Экспрессия в бронхах цитокинов Th1 и Th2 типов и нейтрофилия лаважной жидкости зарегистрированы в эксперименте, сочетающем холодовую и физическую нагрузки у лошадей (M.S. Davis et al., 2007).

В аналогичном эксперименте получены данные об усилении бронхиальной обструкции и гиперчувствительности бронхов при нейтрофилии бронхиального инфильтрата, ввиду чего авторы пришли к выводам:

- 1) нейтрофилы изменяют порог раздражения трахеобронхиальных сенсорных рецепторов;
- 2) нарушение проходимости дыхательных путей корригируется подавлением нейтрофильного компонента воспаления (D. Bedenice et al., 2008).

К цитокинам, праймирующим экзоцитоз провоспалительных ферментов из нейтрофилов, относится IL-8 из CXCL суперсемейства хемокинов, секретируемый активированным эндотелием и занимающий ключевую позицию в хематтракции лейкоцитов, способствующей их выходу из посткапиллярных венул и рекрутированию в очаг воспаления (С.Н. Серебренникова, И.Ж. Семинский, 2008). IL-8 повышает в лейкоцитах концентрацию Ca²⁺, в результате чего стимулируется движение клеток, активируется пентозофосфатный шунт и индуцируется продукция активных форм кислорода (С.Н. Серебренникова, И.Ж. Семинский, 2008).

В числе других провоспалительных цитокинов IL-8 активирует эозинофилы, депонируется и секретируется эозинофилами, наряду с агрессивной цитотоксической пероксидазой (P. Lacy, R. Moqbel, 2000; S.P. Hogan et al., 2008). Кроме того, IL-8 ассоциируется с патогенетическими элементами астмы (B. Puthothu et al., 2006; L.G. Wood et al., 2012). Показаны механизмы взаимодействия IL8 с клетками-мишенями через связывание с α -IL8-рецептором (IL8RA) и роль гена

IL8RA в предрасположенности к развитию астмы (B. Puthothu et al., 2006). Отмечено повышение экспрессии IL8RA и гена IL8RB, кодирующего другой высокоаффинный рецептор IL-8, при астме нейтрофильного воспалительного фенотипа (L.G. Wood et al., 2012).

В наших исследованиях уровень интерлейкина-8 в конденсате выдыхаемого воздуха у больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей в 1,5–2 раза превысил соответствующие уровни у астматиков с другими видами гиперреактивности бронхов (А.Г. Приходько и др., 2014). Согласно полученным нами данным, двукратный прирост концентрации IL-8 и тенденция к повышению уровня IL-12 в конденсате выдыхаемого воздуха происходит и у пациентов с усиленной реакцией бронхов на ингаляцию гипертоническим раствором. Интерлейкин-12 выполняет роль синергиста IL-8 в экспрессии адгезионных молекул на эндотелии с целью привлечения и активации лейкоцитов, стимулирует выработку хемотактантов, цитокинов и факторов роста не только эндотелием, но и фибробластами и лейомиоцитами (И.С. Фрейдлин, 2001; С.Н. Серебренникова, И.Ж. Семинский, 2008). В итоге воспаление в дыхательной системе усиливается и поддерживается, приобретая персистирующее течение.

Респираторный взрыв нейтрофилов запускается активацией клеточных рецепторов, активацией киназ и гуанозинтрифосфатаз, ведущих к фосфорилированию и мембранной передислокации оксидазных компонентов, сборке NADPH-оксидазы (А.Н. Маянский, 2007). Праймирующим агентом по сборке единого нейтрофильного NADPH-оксидазного комплекса в бронхах больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой и осмотический стимулы является, в частности, IL-8. В ходе респираторного взрыва NADPH-оксидаза восстанавливает кислород до супероксиданиона, который далее под действием супероксиддисмутазы спонтанно превращается в H_2O_2 . На этом этапе в респираторный взрыв встраивается МПО, высвобождаемая из азурофильных гранул и конвертирующая оксидативный стресс в галогенирующий.

Лизосомальная МПО, содержащаяся в матриксе азурофильных гранул нейтрофилов и вторичных (специфических) гранул эозинофилов, обладает уникальной способностью катализировать окисление галогенидов (Cl^- , Br^- , I^-) с образованием гипогалогенитов (О.М. Панасенко, В.И. Сергиенко, 2010). Галогенсодержащие реагенты, или активные формы галогенов (О.М. Панасенко, В.И. Сергиенко, 2010), в частности, ионизированная форма хлорноватистой кислоты (HOCl) – гипохлорит, наряду с активными формами кислорода, способны модифицировать активность ядерного транскрипционного фактора $\text{NF-}\kappa\text{B}$ с последующей стимуляцией экспрессии генов провоспалительных цитокинов (Y.S. Jin et al., 2000).

Окислительной модификацией белков обусловлено появление у них антигенных свойств, а окисление липидов приводит к появлению хематтрактантов, увеличивающих миграцию фагоцитов к месту их образования (С.К. Соодаева, 2012). Окислительное повреждение белков и гликопротеинов, реализуемое активными формами галогенов, изменяет активность рецепторов и активирует окислительно-восстановительные и гидролитические ферменты (О.М. Панасенко, В.И. Сергиенко, 2010).

В результате реакций окисления галогенидов развивается перекисное окисление липидов (ПОЛ) (О.М. Панасенко, В.И. Сергиенко, 2010); О.М. Панасенко и др., 2013), проявлением которого служат воспалительная экссудация и инфильтрация в дыхательных путях. Метаболиты ПОЛ утяжеляют реакцию бронхов на осмотический стимул, способствуя утрате контроля над астмой (Ю.М. Перельман и др., 2014). Традиционным индикатором ПОЛ в биологических системах считаются гидроперекиси липидов.

Исходя из современных воззрений, диеновые конъюгаты и гидропероксиды образуются благодаря свободнорадикальному механизму взаимодействия первичных активных форм галогенов (АФГ) с ненасыщенными связями ацильных цепей фосфолипидов (Y. Kawai et al., 2006). Роль инициирующего звена АФГ–индуцированного ПОЛ отводится реакции хлорноватистой кислоты (HOCl) с гидропероксид-

ной группой, всегда содержащейся в том или ином количестве в ненасыщенном липиде в результате его естественного окисления, с образованием пероксильных радикалов, затем трансформирующихся в алкоксильные радикалы (О.М. Панасенко и др., 2013; Y. Kawai et al., 2006). Исследованиями лаборатории под руководством О.М. Панасенко (О.М. Панасенко и др., 2013) доказано, что МПО в присутствии своих субстратов (H_2O_2 и Cl^-), так же как и праймированные нейтрофилы, разрушает активированный гидропероксид с образованием O -центрированных радикалов, идентифицированных как пероксильный и алкоксильный. В случае с гидропероксидом жирной кислоты допущена возможность образования, помимо O -центрированных радикалов, некоторого количества синглетного кислорода (О.М. Панасенко и др., 2013).

Ингибиторный анализ, проведенный с использованием «ловушек» $HOCl$, перехватчиков свободных радикалов и ингибиторов миелопероксидазы, показал, что разрушение гидропероксидной группы в присутствии изолированной МПО или активированных нейтрофилов обусловлено непосредственной работой фермента. Это позволило авторам сделать вывод о реально имеющем место зависимом от МПО $HOCl$ -индуцированном перекисным окислением липидов (О.М. Панасенко и др., 2013).

Следует отметить, что, помимо катализа образования галогенсодержащих оксидантов, миелопероксидаза как катионный протеин специфических гранул эозинофилов осуществляет непосредственную связь с отрицательно заряженной плазматической мембраной клеток-мишеней (S. Baldus et al., 2001). При астме это приводит к утрате извлекаемого из эпителиоцитов фактора релаксации (N.A. Flavahan et al., 1988), десквамации и дисфункции респираторного эпителия (B. Lundbäck et al., 2006). Содержание миелопероксидазы в цитоплазме нейтрофилов и эозинофилов инфильтрата больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой и осмотический стимулы расценено нами в качестве маркера бронхиального воспаления.

Динамика уровня СЦК гранулоцитарной пероксидазы, определяемой по реакции фермента с бензидином в присутствии перекиси водорода в мазках ИМ, связана со многими факторами. К таким факторам относятся синтез МПО в лизосомах, интенсивность респираторного взрыва, потребность в ферменте для реализации агрессивных эффектов оксидативного и галогенирующего стресса вне клеток, аккумуляция фермента в цитоплазматических гранулах с целью его накопления, интенсивность дегрануляции, деструкции и цитолиза клеток. В результате дегрануляции и экзоцитоза МПО во внеклеточное пространство образуются галоидные кислоты и оксиданты. Следовательно, низкие концентрации МПО внутри гранулоцитов, интенсивная дегрануляция и высокие параметры деструкции и цитолиза клеток свидетельствуют об эскалации тканевого воспаления в бронхах. При этом в исходе синтетической и секреторной активности праймированных лейкоцитов могут развиваться не только цитолиз и деструкция, но и некроз, к чему причастны стрессорное напряжение активности лизосом, лабилизация и повреждение клеточных мембран при выбросе окислительных ферментов.

Вторым вариантом функционирования лейкоцитов при воспалении становится мобилизация синтетических ресурсов, приводящая к депонированию МПО в гранулоцитах. Деструкция клеток отражает общебиологические закономерности динамики их функциональной активности (Р.Е. Киселева, Г.Г. Федотова, 2007). С клеточной деструкцией связаны экзоцитоз флогогенных агентов, в том числе лизосомальных ферментов, из гранулоцитов в окружающую среду и прогрессирование воспаления (В.А. Невзорова и др., 2006).

Активные процессы цитолиза и деструкции лейкоцитов сопутствуют синтезу и экзоцитозу ферментов, которые стимулируются оксидативным стрессом. Интенсификация таких процессов ассоциирована с прогрессирующей воспалительной альтерацией, приводящей к лизису клеточной мембраны, изоляции и некрозу клеток (В.А. Невзорова и др., 2006). У больных бронхиальной астмой IL-5–зависимое увеличение экспрессии генов *bcl-2* негативно влияет на апоптоз, про-

лонгирует повреждающую активность эозинофилов, увеличивает долю некротически гибнущих клеток и стимулирует воспаление (И.И. Иванчук и др., 2004). IL-5, IL-6, IL-13 выступают мощными внешними регуляторами апоптоза и некроза клеток, элиминирующими эффекторы воспаления с целью его ограничения.

Нашими исследованиями установлен факт высокого содержания IL-5 в конденсате выдыхаемого воздуха больных бронхиальной астмой с чрезмерной реакцией бронхов на холодовой и гипоосмолярный стимулы (А.Г. Приходько и др., 2014). Данные литературы указывают на супрессию апоптоза и преимущественно некротический путь гибели эозинофилов при астме с последующим выбросом из эозинофилов провоспалительных цитокинов и медиаторов (И.И. Иванчук и др., 2004), а также на повышение числа некротизированных полинуклеаров в индуцированной мокроте больных бронхиальной астмой (В.А. Невзорова и др., 2006), что находит подтверждение в отношении пациентов с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой и осмотический стимулы. Процессы деструкции и цитолиза лейкоцитов, сопровождающие усиленный выброс из клеток МПО, у данных пациентов значительно активируются.

В микроскопической картине мазков ИМ больных бронхиальной астмой с чрезмерной реакцией бронхов на вдыхание холодного воздуха обнаруживается выраженная дегрануляция эозинофильных и нейтрофильных лейкоцитов с экзоцитозом пероксидазо-позитивных гранул во внеклеточное пространство. Кроме того, лейкоциты подвергаются деструкции и цитолизу. В полуразрушенной цитоплазме клеток регистрируются разреженные или единичные гранулы, размером не превышающие 0,2–0,3 мкм (рис. 22-24).

После проведения базовой терапии, дополненной монтелукастом – селективным антагонистом лейкотриеновых рецепторов – средний цитохимический коэффициент МПО в гранулоцитах индуцированной мокроты пациентов растет. В результате после реакции с бензидином цитоплазма эозинофильных лейкоцитов приобретает однородную черную окраску из-за компактного расположения гранул

размером 0,3-0,4 мкм и более; при этом бензидин, окисленный МПО, препятствует обнаружению клеточного ядра (рис. 25).

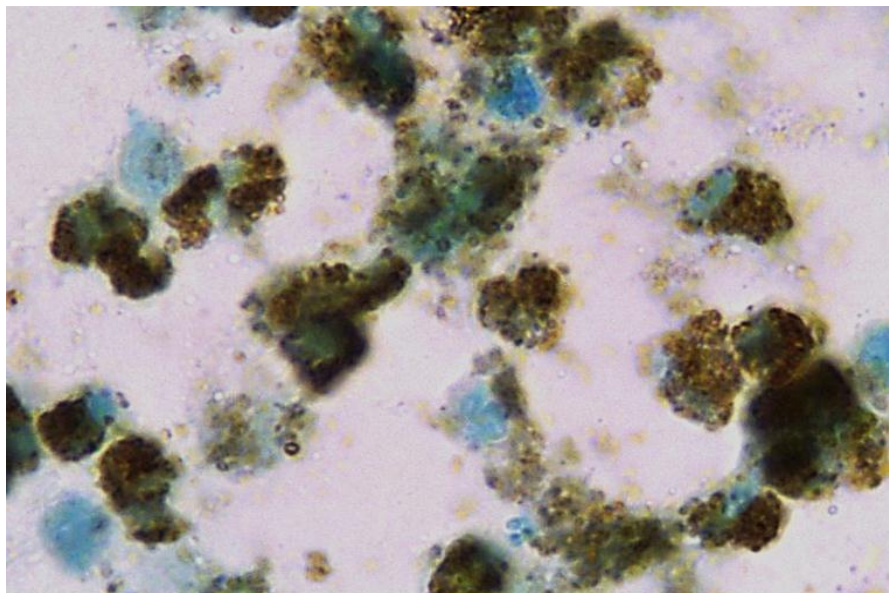


Рис. 22. Дегрануляция пероксидазо-положительных гранул эозинофильных лейкоцитов. Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.

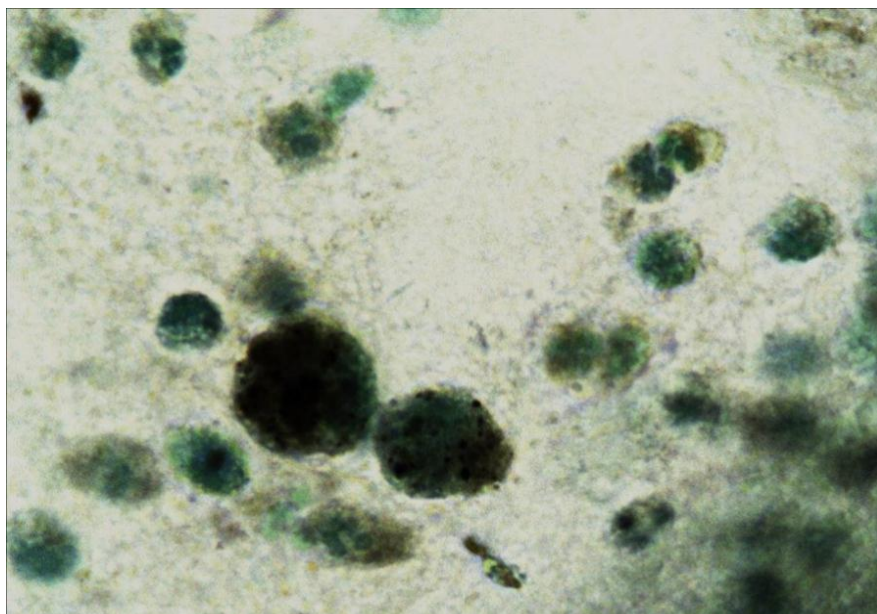


Рис. 23. Дегрануляция пероксидазо-положительных гранул нейтрофильных лейкоцитов. Нейтрофилы с признаками цитоллиза. Высокая активность миелопероксидазы в макрофагах. Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.

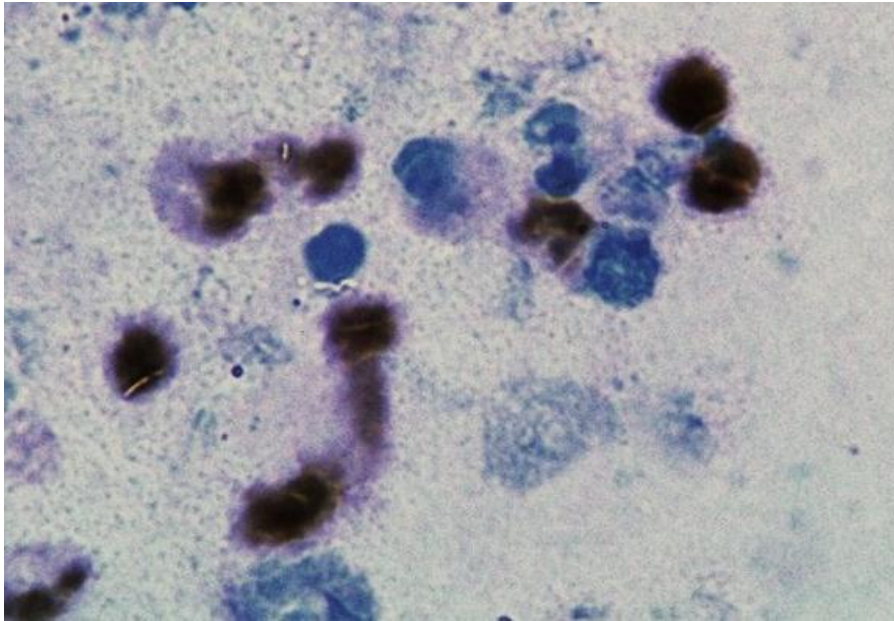


Рис. 24. Низкая активность миелопероксидазы в цитоплазме дегранулирующих сегментоядерных нейтрофилов и высокая активность псевдопероксидазы в эритроцитах (реакция Лепене). Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на холодной стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.

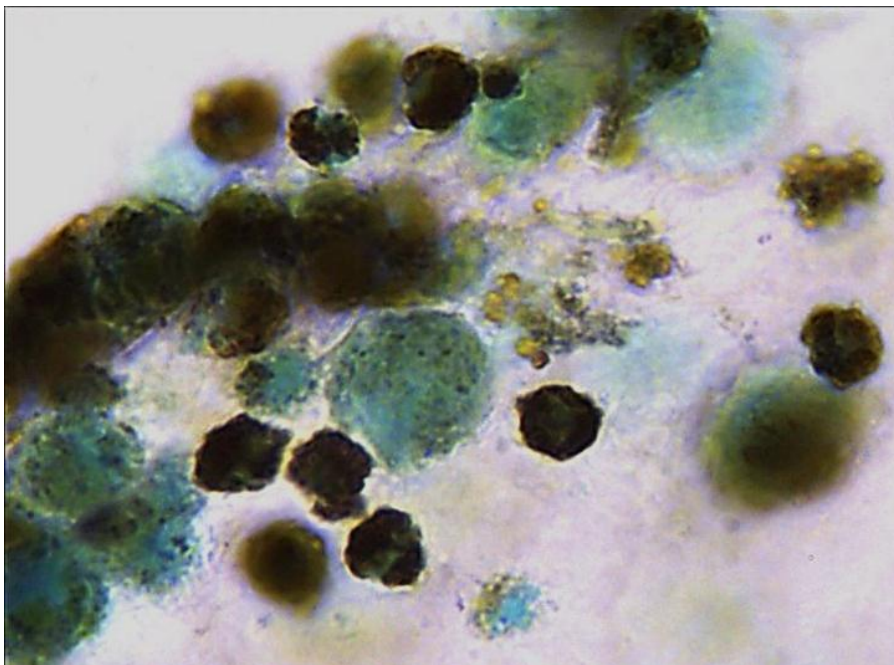


Рис. 25. Высокая активность миелопероксидазы в эозинофильных лейкоцитах. Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на холодной стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.

Активность МПО в нейтрофилах выявляется в виде интенсивно окрашенного диффузно-гранулярного материала, заполняющего цитоплазму и не маскирующего сегменты ядра (рис. 26).

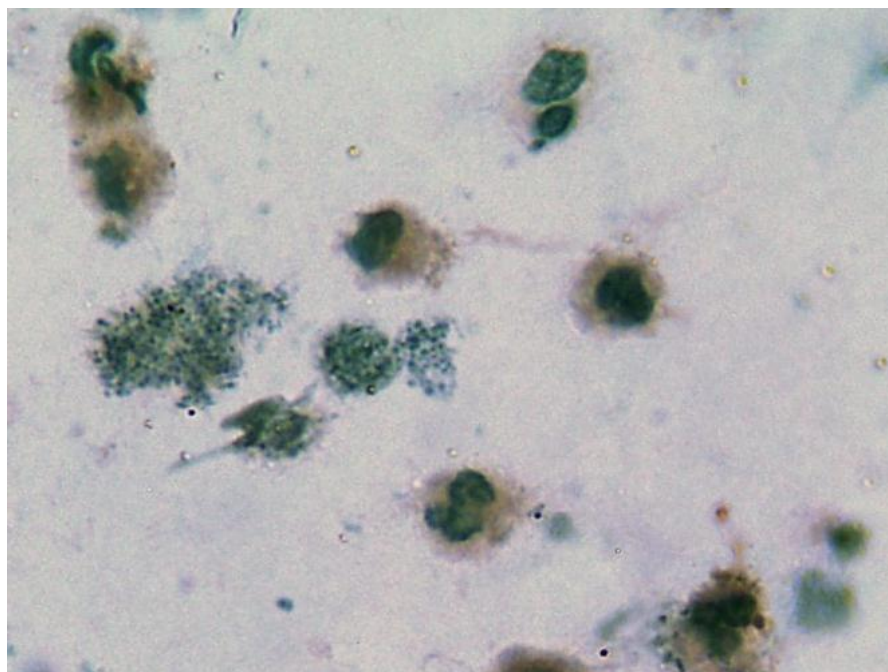


Рис. 26. **Высокая активность миелопероксидазы в сегментоядерных нейтрофильных лейкоцитах.** Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на холодной стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.

У больных с реакцией бронхов на ингаляцию дистиллированной водой также наблюдается уменьшение внутриклеточной плотности миелопероксидазы: маркированные бензидином гранулы лейкоцитов становятся мелкими, неярко окрашенными, разреженными, цитоплазма клеток просветляется (рис. 27). Снижение среднего цитохимического коэффициента МПО эозинофилов и нейтрофилов связано с дегрануляцией и активной секрецией клетками ферментсодержащих гранул (рис. 28), экстрацеллюлярной инициацией галогенирующего стресса.

Вследствие чрезмерной активации лизосом, максимального выброса лизосомальных ферментов в цитоплазму функциональный потенциал лейкоцитов «истощается», и наблюдается цитолиз (рис. 29, 30), развивается клеточная деструкция, отрицательно влияющая на достижение и поддержание контроля астмы (А.Б. Пирогов и др., 2014).

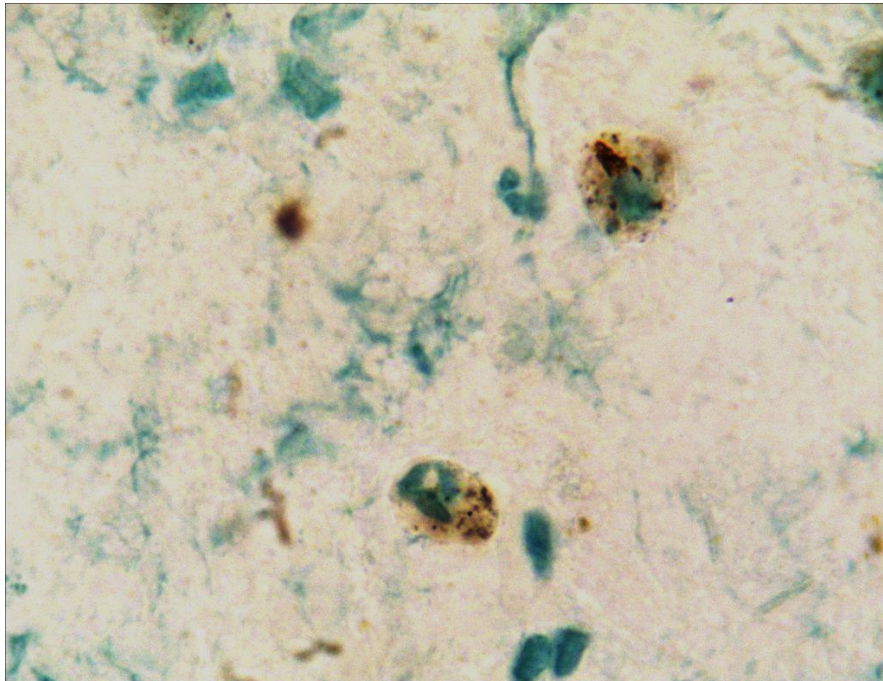


Рис. 27. **Сегментоядерные нейтрофилы с умеренно-слабой активностью миело-пероксидазы в гранулах. Вверху препарата – лизированные клетки. Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на гипосмолярный стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.**

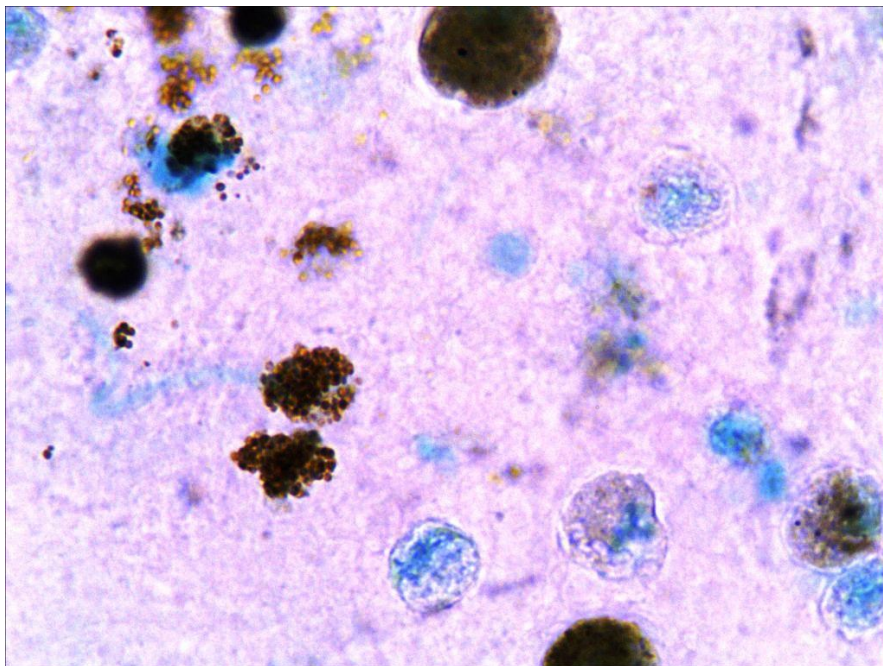


Рис. 28. **Выраженная дегрануляция и цитоллиз эозинофилов. Высокая активность миелопероксидазы в макрофагах. Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на гипосмолярный стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.**

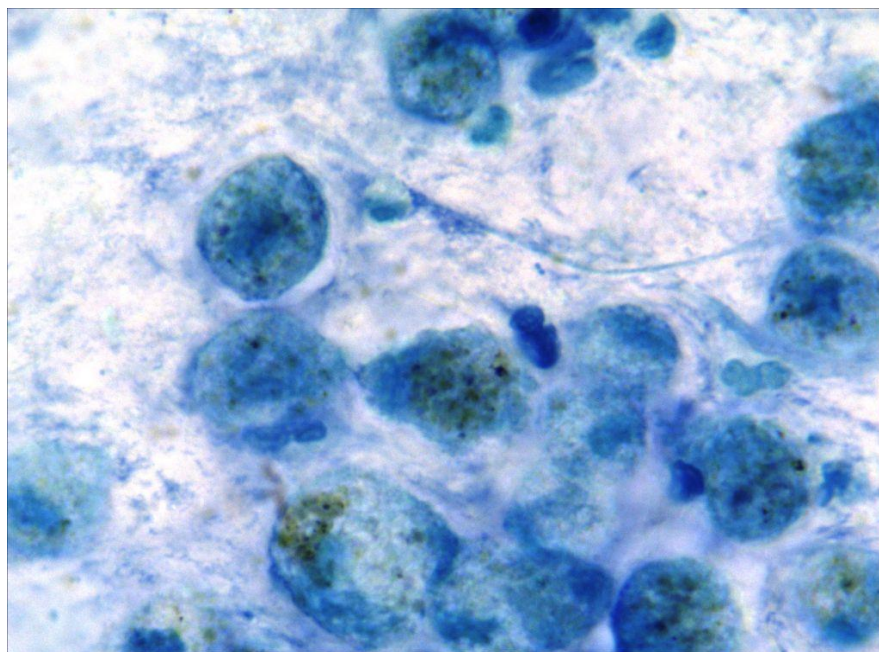


Рис. 29. Цитоллиз нейтрофилов. Низкая активность МПО в цитоплазме нейтрофилов. Умеренная активность МПО в макрофагах. Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.

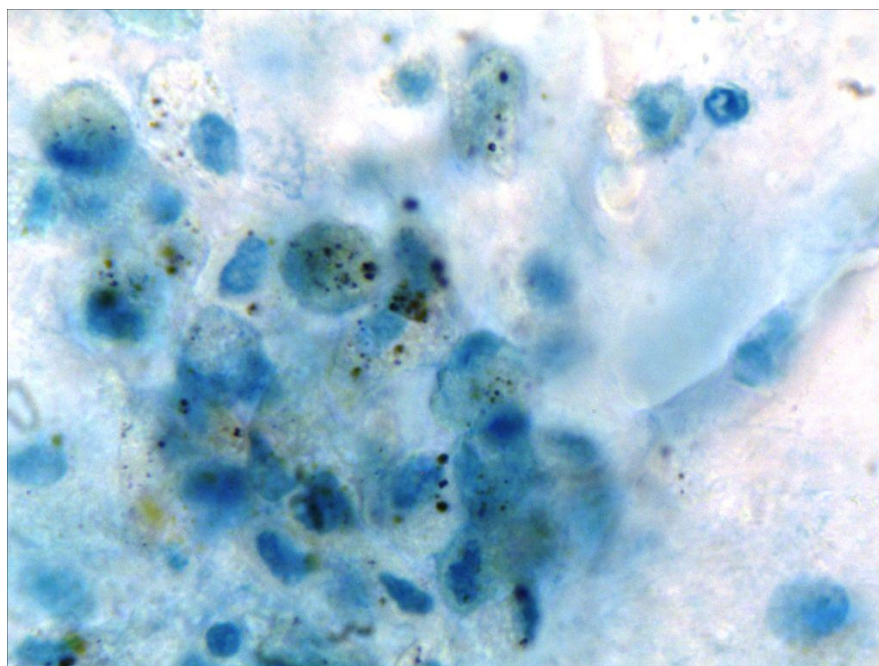


Рис. 30. Цитоллиз нейтрофилов. Низкая активность МПО в цитоплазме нейтрофилов. Слабая активность МПО в макрофагах. В слабо окрашенном азуром участке препарата лизированные лейкоциты. Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.

Роль клеточной деструкции подтверждается корреляционной зависимостью проходимости мелких бронхов от базовых показателей деструкции и цитолиза эозинофилов.

Известно, что при заболеваниях бронхолегочной системы самым уязвимым звеном в патогенезе клеточной деструкции и повреждения субклеточных структур являются мембраны митохондрий (Р.Е. Киселева, Г.Г. Федотова, 2005, 2007). Если антиапоптозные факторы образуются в очаге воспаления, то в межмембранном пространстве митохондрий нейтрофилов содержатся проапоптозные белки, проникающие при апоптозе в цитозоль (Р.Е. Киселева, Г.Г. Федотова, 2005). Изменения в митохондриях вызывают нарушение процессов клеточного дыхания, приводят к снижению интенсивности энергетического обмена, дефициту АТФ и развитию деструкции в других органеллах и клетке в целом (Р.Е. Киселева, Г.Г. Федотова, 2007; S. Bolisetty, E.A. Jaimes, 2013).

Снижение способности нейтрофилов к апоптозу коррелирует с деструкцией митохондриальных крист и свидетельствует о процессах деэнергизации клеток (Р.Е. Киселева, Г.Г. Федотова, 2005, 2007), при этом у больных бронхиальной астмой доказано двукратное увеличение пула низкоэнергизованных клеток, характеризующихся разрушением крист и наружной мембраны митохондрий (Р.Е. Киселева, Г.Г. Федотова, 2007). Одновременно привлекает внимание факт активации лизосомальных ферментов при бронхолегочных заболеваниях. Так, при бронхиальной астме активность кислой фосфатазы нейтрофилов повышается на 22,0% ($p \leq 0,05$) (Р.Е. Киселева, Г.Г. Федотова, 2005), что стимулирует цитолиз и разрушение клеток. Подобное агрессивное воздействие на нейтрофилы следует ожидать, по видимому, и от эффектов усиленно продуцируемой гранулоцитами МПО. Доказательством служат нередкие у больных с осмотической гиперреактивностью бронхов явления выраженной деструкции и лизиса цитоплазмы лейкоцитов, обуславливающие внеклеточное распространение содержимого гранул и завершающиеся пикнозом ядер и клеточным некрозом (рис. 31-35). По всей вероятности, такие явления свойственны наиболее низкоэнергизованным лейкоцитам.

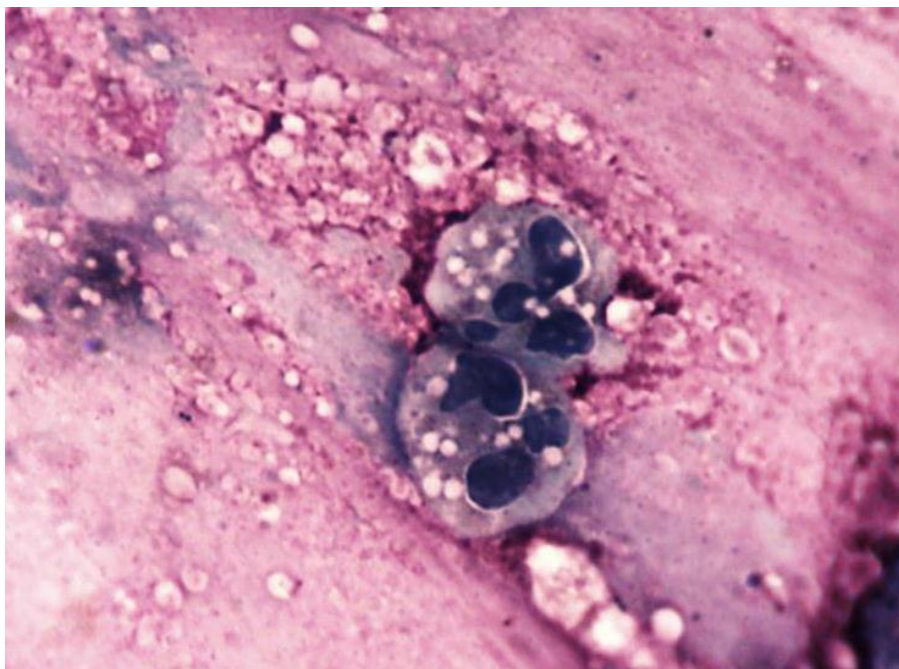


Рис. 31. Начальные этапы деструкции цитоплазмы нейтрофила. Клетка теряет цитоплазматические гранулы. Мазок ИМ больного с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул. Фиксация в парах формалина. Окраска по методу Романовского-Гимза. Ув.×1250.

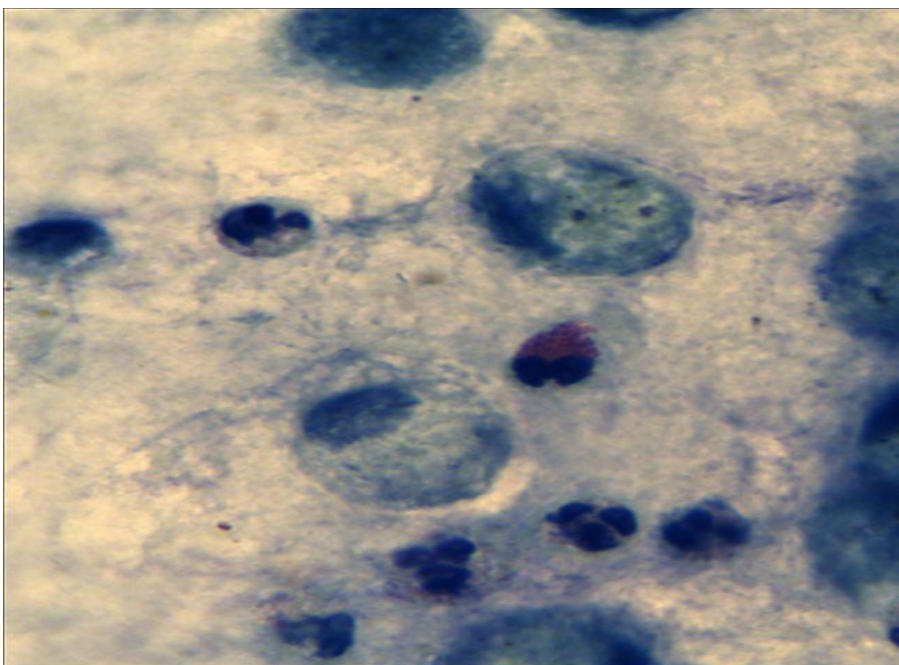


Рис. 32. В центре препарата макрофаги в окружении полинуклеарных лейкоцитов. Пикноз ядерного хроматина в нейтрофилах при сохранении структурной целостности клеток. Мазок ИМ. Фиксация в парах формалина. Окраска по методу Романовского-Гимза. Ув.×1250.

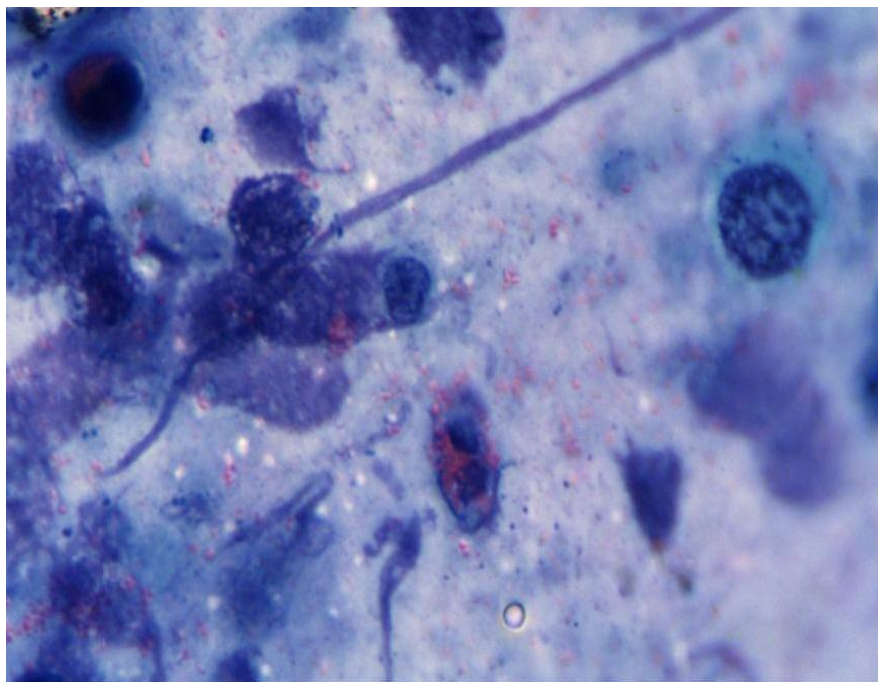


Рис. 33. В центре препарата эозинофил, теряющий целостность цитоплазмы и гранулы, отмечается пикноз ядерного хроматина. Специфические гранулы эозинофила в межклеточном веществе. Мазок ИМ. Фиксация в парах формалина. Окраска по методу Романовского-Гимза. Ув.×1250.

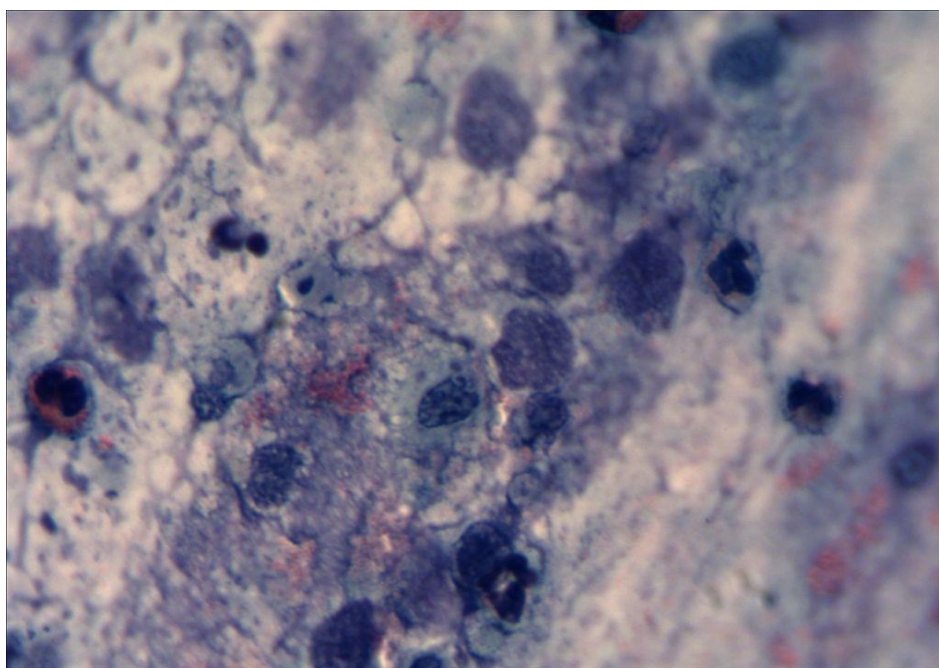


Рис. 34. В центре препарата голые ядра разрушенных эозинофилов и нейтрофилов, цитоплазматические гранулы в межклеточном веществе. В нейтрофилах, сохранивших целостность цитоплазмы, пикноз ядерного хроматина. Мазок ИМ. Фиксация в парах формалина. Окраска по методу Романовского-Гимза. Ув.×1250.

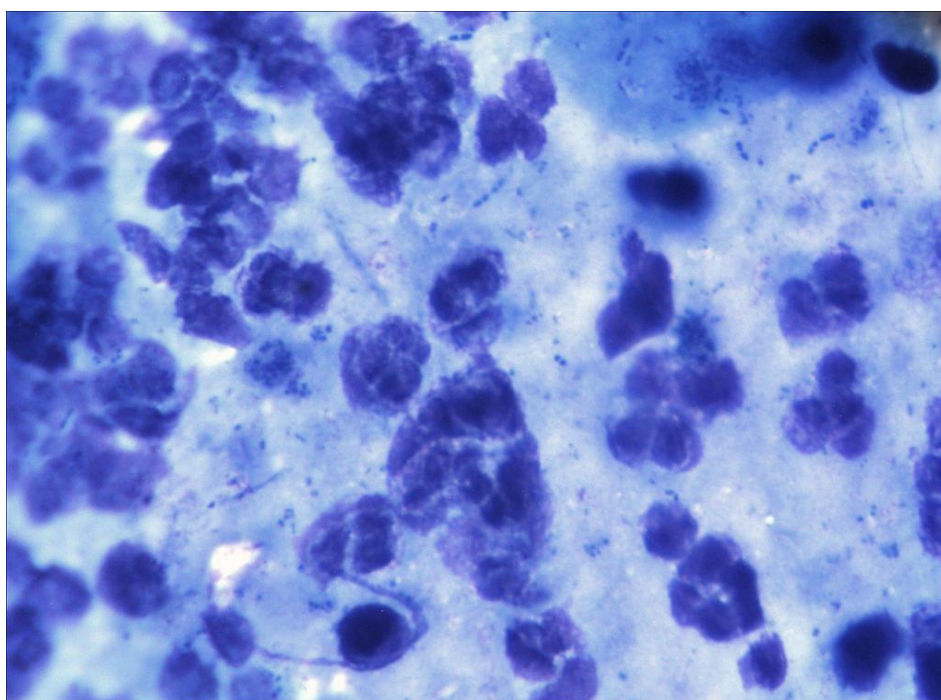


Рис. 35. **Голые ядра полностью разрушенных нейтрофилов.** Мазок ИМ. Фиксация в парах формалина. Окраска по методу Романовского-Гимза. Ув.×1250.

Высокое содержание цитоплазматической МПО может трактоваться как следствие непрерывного пополнения функционального резерва гранулоцитов, их постоянной готовности к дегрануляции и экзоцитозу. Результатом является проникновение во внешнюю среду медиатора, который способствует образованию активных форм галогенов и свободных радикалов, индуцирует оксидативный стресс, процессы ПОЛ и персистенцию воспаления. На примере реакции окисления пероксидазой бензидина в мазках индуцированной мокроты больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью бронхов на гиперосмолярный стимул видно, насколько плотно, диффузно или зернисто, располагается окрашенный в черный цвет фермент в цитоплазме полиморфноядерных лейкоцитов. В цитоплазме локализованы либо хорошо различимые отдельные гранулы, отчетливо маркированные бензидином и имеющие вид крупных зерен (рис. 36), либо объем цитоплазмы заполнен сливными гранулами, формирующими однородные глыбчатые структуры интенсивной черной окраски (рис. 37).

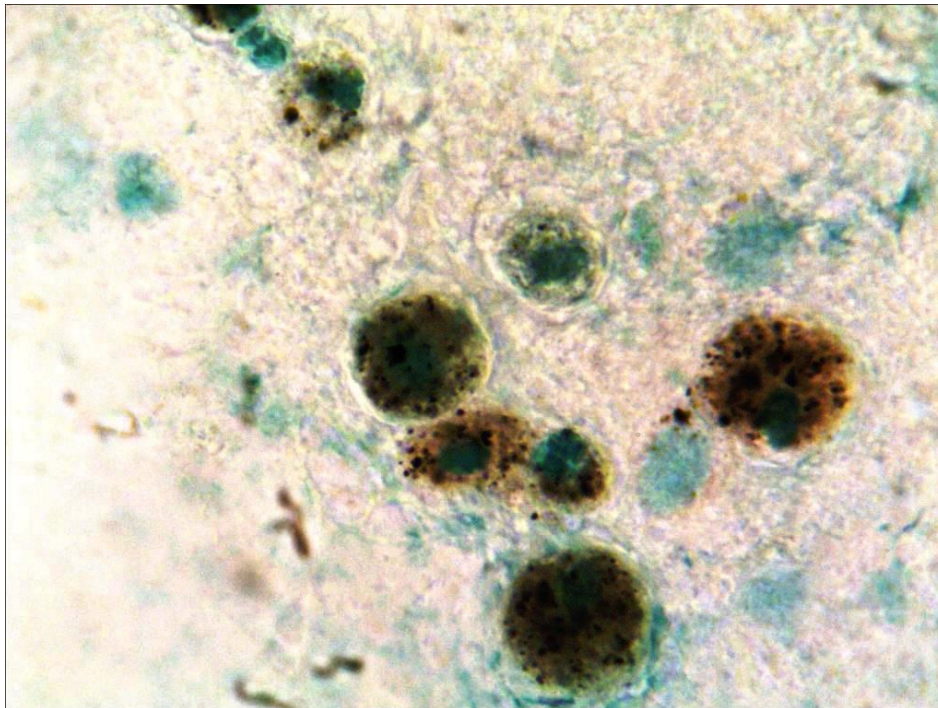


Рис. 36. **Высокая активность миелопероксидазы в гранулах полинуклеарных лейкоцитов и макрофагах маркируется отложением бензидина в виде зерен. Мазок ИМ больного с гиперреактивностью бронхов на гиперосмолярный стимул. Окраска бензидином. Ув.×1250.**

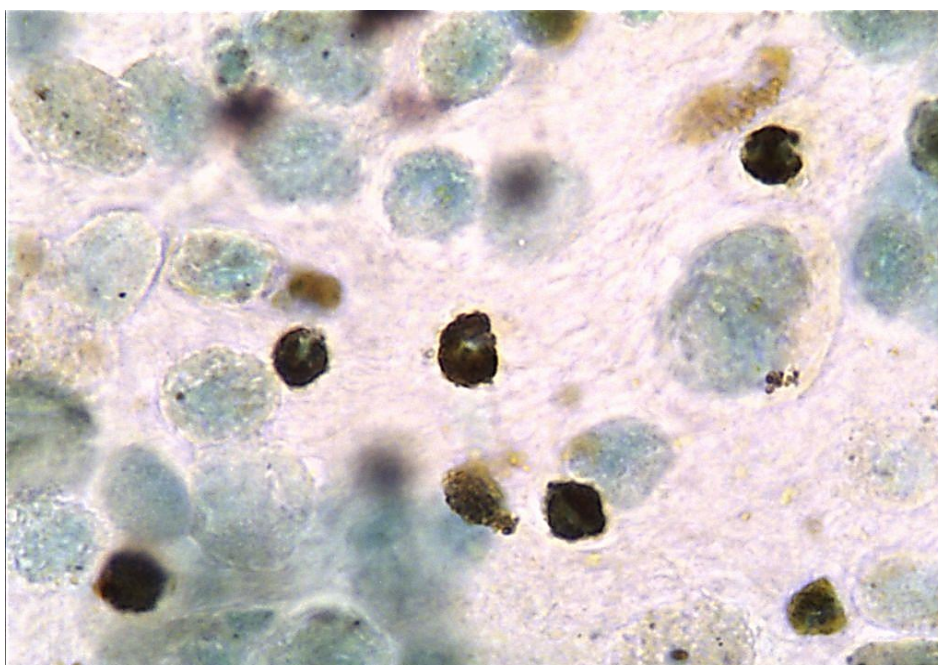


Рис. 37. **Высокая активность миелопероксидазы в сегментоядерных лейкоцитах маркируется преимущественно сливными глыбками бензидина, заполняющими цитоплазму. В макрофагах реакция на пероксидазу отсутствует. Мазок ИМ. Окраска бензидином. Ув.×1250.**

Вариабельность интенсивности цитолиза и деструкции эозинофильных и нейтрофильных лейкоцитов свидетельствует о степени участия МПО в окислении биологически важных молекул и о роли фермента в поддержании интенсивности оксидативного стресса и развитии гиперреактивности дыхательных путей. Концентрация МПО внутри и вне клеток изменяется в зависимости от утилизации фермента при образовании оксидантов, уровня «истощения» ферментативного запаса клеток и компенсаторного нарастания лизосомального синтеза и гранулярного депонирования фермента. Неизменным является дисбаланс тканевого окислительно-восстановительного равновесия в сторону нарастания прооксидантов, чему способствует высокое количество нейтрофилов в популяции гранулоцитов инфильтрата бронхов больных бронхиальной астмой.

Изменчивость фенотипа воспаления бронхов призвана характеризовать тяжесть бронхиальной астмы. Считается, что у пациента может наблюдаться несколько клеточных фенотипов воспаления: во время обострения бронхиальной астмы у взрослых и детей чаще выявляется нейтрофильный фенотип, в период ремиссии – эозинофильный (Г.Б. Федосеев и др., 2015; F. Wang et al., 2011). Эозинофилии мокроты в литературе предписывают высокую прогностическую чувствительность, так как нарастание эозинофилии предшествует обострению бронхиальной астмы (J.D. Leuppi et al., 2001), а эозинофильный фенотип воспаления сопровождается хорошим ответом на лечение иГКС и анти-IL-5-препаратами (M. Berry et al., 2007; P. Nair et al., 2013). Вместе с тем допускается, что увеличение уровня эозинофилов в мокроте сочетается с нарастанием степени тяжести болезни, вследствие чего доля эозинофилов рассматривается в качестве маркера тяжести течения бронхиальной астмы (A. Vandyopadhyay et al., 2013).

При изучении ИМ больных бронхиальной астмой, подвергнутых комбинированной терапии будесонидом/формотеролом в режиме ступенчатого увеличения и длительного дозирования препаратом, у пациентов с гиперреактивностью бронхов к холодovому стимулу на

старте и по окончании исследования установлены стабильно высокие показатели нейтрофильного звена воспалительного ответа. В отличие от уменьшающихся к окончанию периода наблюдения количественных показателей эозинофилов, показатели числа нейтрофилов проявляют инерцию по отношению к лечению. Отсюда сделан вывод, что в клинической практике использование режима базовой противовоспалительной терапии и длительного лечения с применением комбинированного препарата будесонид/формотерол, ориентированное на достижение клинических критериев контроля над бронхиальной астмой у больных с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей, не позволяет достигнуть контроля нейтрофильного звена воспаления бронхов.

Проблема оптимальной персонализированной терапии астмы у больных бронхиальной астмой с реакцией бронхов на холодовой и осмотический триггеры не ограничивается поиском адекватной медикаментозной коррекции нейтрофильного компонента, способствующего уязвимости пациентов к риску возможной утраты контроля над болезнью в случае его достижения. Фактором устойчивой инициации воспаления и оксидативного стресса у таких больных являются также синтез, аккумуляция и секреция МПО, деструкция и цитоллиз лейкоцитов, высокие параметры которых, как и количество нейтрофилов, имеют прогностическое значение для течения астмы.

Подвижность и стойкость воспалительно-инфильтративных процессов, связанных с активацией продукции и секреции МПО, интенсивностью цитолиза и деструкции нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов, фатально разыгрывающихся в популяции, обладающей значительной долей нейтрофилов, служат платформой для формирования клеточных паттернов воспаления дыхательных путей с реакцией на холодовой и осмотический стимулы. Характеристика фенотипа воспаления бронхов у больных бронхиальной астмой с холодовой и осмотической гиперреактивностью дыхательных путей основывается на вариабельности его паттернов, включающей динамику соотношения пулов гранулоцитов, степени возрастания количества и

роли нейтрофилов, уровня высокой пероксидазной и деструктивно-цитолитической активности лейкоцитов. Паттерны воспаления бронхов с неоднозначными, но неизменно высокими значениями нейтрофилов, активностью МПО, интенсивностью деструкции и цитолиза гранулоцитов на фоне готовности клеток как к ферментативному синтезу и накоплению, так и к дегрануляции и лизису, морфологически верифицируются в рамках традиционного эозинофильного воспалительного фенотипа. Исследование полиморфной картины воспаления бронхов имеет непосредственное отношение к пониманию патофизиологических механизмов холодовой и осмотической гиперреактивности, эндотипированию больных астмой с реакцией дыхательных путей на различные триггеры и к выбору эффективного персонализированного лечения болезни.

Глава 5. ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС И ОСМОТИЧЕСКАЯ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Известно, что на любые значимые изменения окружающей среды организм реагирует неспецифической стрессовой реакцией со стороны нейроэндокринной системы, органов кровообращения, дыхания, на тканевом уровне - усилением процессов свободно-радикального окисления (СРО), в том числе перекисного окисления липидов (ПОЛ). Образующиеся вследствие этого процесса токсические продукты, такие как H_2O_2 , который может восстанавливаться ионами Fe^{2+} и Cu^+ до опасного гидроксильного радикала (OH^\cdot), способны окислять чрезвычайно широкий спектр веществ, в том числе ДНК, и являться потенциальными маркерами окислительного стресса в легких. ПОЛ вызывает нарушение упаковки мембранных слоёв и возможное последующее нарушение целостности клеточной мембраны, что сопровождается различными патологическими процессами, в частности, воспалением и т.д. Процесс разрушения клеток продолжается до включения клеточной антиоксидантной системы.

В то же время, следует подчеркнуть, что характер воспалительных изменений при разных формах заболеваний органов дыхания носит существенные фенотипические отличия. Если роль оксидативного стресса, как важного участника и регулятора системных реакций при ХОБЛ достаточно хорошо исследована, то в отношении бронхиальной астмы, характеризующейся выраженным клиническим полиморфизмом, имеются существенные пробелы в понимании значимости оксидативного стресса в формировании бронхиальной обструкции и тяжести её течения.

В данной связи изучение маркеров оксидативного стресса и воспаления в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) и сыворотке крови, включение их в дифференциальный алгоритм постановки диагноза с целью улучшения качества прогноза развития заболевания и индивидуального подхода к терапии больного бронхиальной астмой являются одними из важных задач пульмонологии.

5.1. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе бронхиальной астмы и гиперреактивности дыхательных путей

Экспериментальные и клинические данные убедительно свидетельствуют, что хроническое воспаление дыхательных путей и оксидативный стресс играют ключевую роль в патогенезе развития и прогрессирования бронхиальной астмы, а также таких заболеваний респираторного тракта, как хроническая обструктивная болезнь легких, муковисцидоз, интерстициальные заболевания легких, бронхиты (Б.Т. Величковский, 2001; С.А. Геронина, 2004; С.Б. Болевич, 2006; О.А. Лебедько и др., 2007, 2011; А.В. Лисица и др., 2010; P.J. Barnes, 1990, C.J. Doelman, A. Bast, 1990; F.J. Kelly, 2003; W. MacNee, 2005; N. Li et al., 2008; E. Zinellu et al., 2016). Оксидативный стресс является основополагающим фактором, ведущим к повреждению эпителия бронхов. Дефицит в питании таких антиоксидантов как бета-каротин и витамины С и Е может снижать устойчивость и повышать восприимчивость к воздействию оксидантов, приводя к воспалению в респираторной системе (A. Fogarty, J. Britton, 2000; L.G. Wood et al., 2003). Напротив, включение в диету антиоксидантных витаминов, как показали популяционные исследования, проведенные в Сингапуре, оказывало положительное влияние на функцию легких у пожилых людей (T.P. Ng et al., 2014).

Согласно теории свободнорадикального окисления, сформулированной Бахом, окисление органической молекулы кислородом протекает по принципу цепного механизма. Инициаторами окисления всегда выступают свободные радикалы - частицы, имеющие неспаренный электрон. Следует подчеркнуть, что активные формы кислорода при физиологических условиях выполняют важнейшие регуляторные и метаболические функции в организме. Свободнорадикальные реакции нужны для образования многих жизненно важных ферментов, а также для нормальной функции иммунной системы и её компонентов (нейтрофилы, макрофаги и др.). Они абсолютно необхо-

димы для активации многих транскрипционных факторов, участвующих в экспрессии генов, осуществляют трансдукцию гормональных и клеточных сигналов, регулируют процессы биоэнергетики, окисления ксенобиотиков, бактерицидной защиты, клеточного размножения, апоптоза (О.К. Непряхина и др., 2008; H.J. Forman, M.Torres, 2002; S. Psarras et al., 2005; T.E. Taylor-Clark, B.J. Udem, 2011). Свободнорадикальное окисление лежит в основе синтеза многих биологически активных соединений, таких, как лейкотриены, пуриновые дезоксирибонуклеотиды, мочева кислота, макроэргические соединения, играя немаловажную роль в регуляторных процессах. Резкие колебания их концентрации в клетках и тканях служат причиной формирования различных патологических состояний как в отдельном органе, так и в организме в целом (О.А. Азизова и др., 2011; Е.В. Силина и др., 2011; T. Fujisawa, 2005; P.D. Wagner, 2008).

Свободные радикалы и активные формы кислорода в основном образуются при последовательном присоединении электронов к кислороду и в процессе перекисного окисления липидов (ПОЛ), формируя один из путей утилизации кислорода в клетке. ПОЛ мембран клеток является одной из защитных реакций, необходимых для обновления фосфолипидов клеточных мембран (В.Л. Воейков, 2002) и поддержания гомеостаза организма.

В то же время процессы ПОЛ вносят свой вклад в развитие как острых воспалительных реакций, так и их хронизации (J.L. Cracowski et al., 2001; W.R. Pohl, 2005). Особое место в научных изысканиях отводится изучению баланса уровня продукции ПОЛ и антиоксидантной системы при хронических болезнях органов дыхания (Л.В. Хрипач и др., 2004; С.Б. Болевич, 2006; Ю.Н. Черных и соавт., 2012; С.В. Andreassen, 2003; W.R. Pohl, 2005; Y.S.Cho, H.B. Moon, 2010; P.A. Kirkham et al., 2011). Как известно, эпителий воздухоносных путей является уникальной мишенью для окислительного повреждения, поскольку респираторный тракт постоянно подвергается воздействию и эндогенных, и экзогенных свободных радикалов, в первую очередь, кислорода – внешнего инициатора окисления, а также оксидантов, со-

держатся в достаточном количестве в атмосферном воздухе. Многие негативные факторы окружающей среды (загрязнение воздуха выхлопными газами транспортных средств, выбросами промышленных предприятий, другими поллютантами химической природы, погодные условия, радиационное и ультрафиолетовое излучение), ксенобиотики, в том числе лекарства, курение, чрезмерная физическая нагрузка, стресс, переутомление, провоцируют повышенное образование свободных радикалов (Б.Т. Величковский, 2001; Н.М. Горячкина и др., 2010; С.А. Гармаш, 2012; В.В. Зинчук, Д.Д. Жадько, 2012; С.К. Соодаева, 2012; М.Д. Смирнова и др., 2013; Y.S.Cho, H.V. Moon, 2010).

С другой стороны, вследствие морфологических и функциональных особенностей строения дыхательных путей высока вероятность эндогенной гиперпродукции оксидантов. Эндогенные радикалы, образующиеся *in vivo*, принято делить на первичные, вторичные и третичные. Первые из них (семихиноны, $\bullet\text{O}^{2-}$, $\bullet\text{NO}$) образуются в ферментативных реакциях (дыхательная цепь переноса электронов, ферментативные системы клеток крови и сосудов) и являются необходимыми компонентами для нормального функционирования клеток и организма в целом. Вторичные ($\bullet\text{OH}$, липидные радикалы: $\text{L}\bullet$, $\text{LO}\bullet$, $\text{LOO}\bullet$ и др.) возникают при неферментативных реакциях с участием молекулярных предшественников, таких как H_2O_2 , гидроперокси липидов (LOOH) и др. Третичные образуются в результате перехвата вторичных радикалов антиоксидантами-ловушками (α -токоферол, тироксин и т.д.). Вторичные радикалы обладают сильным цитотоксическим действием, необратимо повреждая мембранные липиды, а также молекулы ДНК, углеводов и белков. Именно образование вторичных радикалов, вступающих в реакции со многими биологически важными молекулами, приводит к патологическому состоянию и развитию различных заболеваний (Ю.А. Владимиров, 1998; Н.Б. Кармен и др., 2011; О.М. Панасенко и др., 2013; Y.S.Cho, H.V. Moon, 2010). Основным субстратом для реакций ПОЛ служат ненасыщенные жирные кислоты лёгочной ткани. Воздействие на дыха-

тельные пути поллютантов различной природы, аллергенов и микроорганизмов повышает активность эозинофилов, нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов, продуцирующих значительное количество активных форм кислорода, запускающих процессы ПОЛ (С.К. Соодаева, 2006; С.К. Соодаева, И.А. Климанов, 2009; L.G. Wood et al., 2003; F.J. Kelly, 2003; Y.S.Cho, H.V. Moon, 2010).

Источники активных форм кислорода в лёгких многообразны. Прежде всего, это фагоцитирующие клетки, обладающие мощными специализированными системами генерации активных форм кислорода. При контакте фагоцитов с чужеродными частицами (бактериями, аллергенами, поллютантами и т.д.) происходит активация клеток с образованием свободных радикалов. Этот феномен получил название "супероксидного" взрыва. Бактерицидный эффект фагоцитов осуществляется действием активных форм кислорода внутри фаголизосом, а цитотоксический - действием на объекты, расположенные вне фагоцита, посредством выброса свободных радикалов из клетки в её микроокружение (Л.М. Абдрахманова и др., 2001; Y.S.Cho, H.V. Moon, 2010; M. Tobler et al., 2015).

Одним из наиболее важных молекулярных предшественников свободных радикалов в организме является хлорноватистая кислота (НОСl), соль которой называется гипохлоритом (ОСl⁻). НОСl образуется путём преобразования реакции: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{НОСl} + \text{H}_2\text{O}$, $\text{НОСl} \leftrightarrow \text{ОСl}^- + \text{H}^+$, катализируемой ферментами, относящимися к семейству пероксидаз: миелопероксидазой (МПО), пероксидазой эозинофилов (ЭПО). НОСl имеет рН 7,5. Это значит, что при физиологическом значении рН НОСl и ОСl⁻ присутствуют в водной среде примерно в равных концентрациях. Сама по себе НОСl, будучи сильным окислителем, обладает бактерицидными свойствами, в то же время, вследствие повышенной реакционности, выполняет роль молекулы-предшественника свободных радикалов, реагируя со многими биологически важными молекулами, оказывает цитотоксический эффект провоцируя развитие целого ряда заболеваний, сопряжённых с воспалительной реакцией организма (О.М. Панасенко и др., 2013).

Необходимо отметить, что реакции с HOCl сами по себе не ведут к образованию свободных радикалов, но при этом образуются молекулы, распадающиеся на свободные радикалы или вступающие в дальнейшие реакции с образованием свободных радикалов. Прежде всего, это реакция с H_2O_2 ($\text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$), в результате которой образуется синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), способный взаимодействовать с ненасыщенными связями липидов в 1500 раз активнее триплетного с образованием гидропероксидов, что приводит к иницированию перекисного окисления липидов (В.Е. Каган и др., 1986). Кроме того, HOCl реагирует с ионами металлов переменной валентности, в частности с Fe^{2+} или супероксидным анион-радикалом ($\bullet\text{O}_2^-$) с образованием чрезвычайно реакционного $\bullet\text{OH}$ -радикала – эффективного инициатора свободнорадикальных реакций ПОЛ (О.М. Панасенко и др., 2013; L.P. Candeias et al., 1993; W. Freinbichler et al., 2011).

Первым ответом на появление чужеродных микроорганизмов является стимуляция лейкоцитов, что сопровождается изменением их формы, адгезией, направленным движением в очаг повреждения, усиленным потреблением кислорода («кислородным взрывом»), дегрануляцией. Дегрануляция характеризуется слиянием цитоплазматических гранул с фагосомой, поступлением туда содержащихся в гранулах ферментов и частичной секрецией этих ферментов (в том числе, с непосредственным участием миелопероксидазы) во внеклеточное пространство (А.Н. Маянский, Д.Н. Маянский, 1983; О.М. Панасенко и др., 2013; Y.S.Cho, H.V. Moon, 2010).

Стимуляция лейкоцитов сопровождается активацией мембрано-связанного фермента НАДФН-оксидазы, который катализирует образование $\bullet\text{O}_2^-$. Последний спонтанно или же под действием другого фермента – супероксиддисмутазы – дисмутирует до перекиси водорода (О.М. Панасенко и др., 2013). При активации лейкоцитов во внеклеточную среду секретруется фермент миелопероксидаза, который, используя перекись водорода в качестве субстрата, катализирует окисление Cl^- до HOCl . Каждое из упомянутых соединений ($\bullet\text{O}_2^-$,

НОСl, H₂O₂) может в результате цикла биохимических реакций явиться источником •ОН-радикала или синглетного кислорода ($1O^2$). •ОН-радикал, отрывая атом водорода от ненасыщенного липида (L), образует алкильный радикал (L•), реализуя, таким образом, стадию иницирования ПОЛ. L• в аэробных условиях присоединяет молекулу кислорода с образованием пероксильного радикала (LOO•), из которого в свою очередь и возникает гидропероксид (LOOH). Последний может образоваться также по молекулярному механизму (без участия свободных радикалов) при взаимодействии ненасыщенного липида с синглетным кислородом ($1O_2$), который в свою очередь возникает в реакции НОСl с H₂O₂ или гидропероксидом жирнокислотной цепи. Гидропероксид может быть восстановлен ионами Fe²⁺ до алкоксильного радикала (LO•), а может быть окислен под действием НОСl до пероксильного радикала. Оба радикала дают начало цепному свободнорадикальному перекисному окислению липидов (О.М. Панасенко и др., 2013; R. Dworski, 2000).

Гидроперекиси и кислородные радикалы активируют в лёгких фосфолипазу А₂, а также хемотаксические пептиды и цитокины, которые вызывают выход и активацию фагоцитирующих клеток. Супероксидный анион и перекись водорода постоянно образуются во внутриклеточных метаболических процессах, например, при окислительном фосфорилировании в митохондриях, микросомальном окислении или при работе оксидаз в пероксисомах (S. Bolisetty, E.A. Jaimes, 2013). В условиях гипероксии или воздействия атмосферных поллютантов, холода, аллергенов клеточные органеллы митохондрии и микросомы становятся эффективными источниками свободных радикалов.

В эпителиальных клетках бронхов и лёгочной ткани человека и животных выявляется высокое содержание ксантиндегидрогеназы. В условиях действия на респираторный тракт сильных прооксидантов, таких как озон, происходит окисление сульфгидрильных групп фермента и переход ксантиндегидрогеназы в оксидазную форму, которая в свою очередь является достаточно мощным источником активных

форм кислорода. Провоспалительные же эффекты оксидантов и их регулирующее влияние на внеклеточный метаболизм связаны со способностью модифицировать активность ядерного транскрипционного фактора κB , активирующего протеин 1, с последующей стимуляцией экспрессии генов провоспалительных цитокинов (С.К. Соодаева, И.А. Климанов, 2009; Y.S. Jin et al., 2000; K. Natarajan et al., 2016).

Эозинофилия периферической крови идентифицируется как предвестник развития аллергического воспаления и обструкции дыхательных путей. В процессе аллергической реакции при взаимодействии тучной клетки с антигеном происходит выброс биологически активных веществ, в том числе и фактора хемотаксиса. Последний вызывает возбуждение нейтрофилов и эозинофилов, которые начинают усиленно генерировать активные формы кислорода, что приводит к выбросу тучными клетками гистамина, повышенной продукции ПОЛ в нейтрофилах и эозинофилах. Продуктами метаболизма данного процесса являются такие сильные бронхоконстрикторы, как лейкотриены.

Повышенное содержание в очаге воспаления эозинофилов с одной стороны служит защитной реакцией, поскольку лишь эти клетки располагают значительным запасом арилсульфатазы – фермента, инактивирующего медиаторы воспаления липидной природы. С другой стороны, эозинофилы также способны индуцировать образование свободных радикалов, постоянно находясь в активированном состоянии (R. Dworski, 2000; S. Sannohe et al., 2003). Как было показано нами ранее, у больных бронхиальной астмой уровень пероксида водорода в конденсате выдыхаемого воздуха тесно коррелировал с количеством эозинофилов в индуцированной мокроте и холодовой гиперреактивностью дыхательных путей (Н.М. Федосеева и др., 2008; J.M. Perelman et al., 2009).

За поддержание концентрации свободных радикалов на стационарном, безопасном физиологическом уровне ответственна антиоксидантная система, которая включает в себя несколько защитных барьеров. Первый представляет собой смесь трахеобронхиальной слизи,

гликопротеидов и сахаров, способных инактивировать перекись водорода и гидроксильный радикал. Вторым барьером является сурфактант, в поверхностноактивной фракции которого содержатся ферменты супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза, третий – составляют, собственно, антиоксиданты (Н.К. Зенков и др., 2000; С.К. Соодаева, 2006; С.К. Соодаева, И.А. Климанов, 2009; V.L. Kinnula, J.D. Crapo, 2003; C. Sackesen et al., 2008). Основная часть антиоксидантной системы лёгких сконцентрирована в жидкости, выстилающей эпителий респираторного тракта.

Нарушение баланса между концентрацией свободных радикалов и функциональным состоянием антиоксидантной системы в сторону увеличения продукции оксидантов приводит к развитию оксидативного стресса (L. Forsberg et al., 2001; P. Montuschi et al., 2003, 2004; W.D. MacNee, 2005; M.A. Riedl et al., 2008; L. Zuo et al., 2016). Он выражается в избыточной продукции активных форм кислорода, пероксидов и их вторичных продуктов и недостаточности антиоксидантной защиты. Функциональная недостаточность антиокислительной защиты ведёт к лавинообразному прорыву активных форм кислорода, что вызывает нарушение защитных и регуляторных функций, процессов биоэнергетики, пролиферации клеток, а также индукции апоптоза (С.К. Соодаева, 2012).

Неконтролируемая генерация свободных радикалов приводит к повреждению наиболее важных полимеров – нуклеиновых кислот, белков, липидов и возникновению клеточных мутаций, заканчиваясь гибелью клеток или их злокачественным перерождением (Ю.А. Владимиров, 1989; Н.В. Рязанцева и др., 2010; L. Zuo et al., 2016). Окислительная модификация белков придаёт им антигенные свойства, а продукты перекисного окисления липидов усиливают выработку хемоаттрактантов с миграцией фагоцитов к зоне их образования. Активация фагоцитов обладает свойством самопроизвольно усиливаться, формируя порочный круг в очагах воспаления (С.К. Соодаева, И.А. Климанов, 2009).

Вследствие протекающих свободнорадикальных процессов с выработкой и привлечением в очаг воспаления цитокинов, образованием пероксинитрита (при взаимодействии оксида азота с супероксидом) происходит структурная перестройка стенки воздухоносных путей, лёгочной ткани, микроциркуляторного русла с нарушением проницаемости сосудистой стенки, альвеолярного эпителия, появлением вазоконстрикции и гиперреактивности дыхательных путей.

Таким образом, каскад свободнорадикальных реакций может проявляться клиникой бронхообструкции. Кроме того, воздействие активных форм кислорода на жидкость, покрывающую эпителий, приводит к увеличению вязкости мокроты вследствие образования дисульфидных водородных связей между молекулами муцина с их полимеризацией, изменение соотношения фракций золя и геля в сторону последнего (С.К. Соодаева, И.А. Климанов, 2009; L.D. Martin et al., 1998; S. Yuan et al., 2015). Эти события сопровождаются нарушением мукоцилиарного клиренса. Кроме того, доказано, что оксидативный стресс способен вызывать у больных бронхиальной астмой резистентность к глюкокортикостероидным препаратам (P.J. Barnes, 2010).

Как известно, перекись водорода активирует калиевые каналы плазматической мембраны, дозозависимо усиливает окислительный взрыв нейтрофилов и макрофагов в ответ на хемотаксический пептид, опосредует хемотаксис гладкомышечных клеток к тромбоцитарному фактору роста, ускоряет выход органических анионов из макрофагов, влияет на циклооксигеназную активность эпителиальных клеток и тромбоцитов, усиливая секрецию простагландинов, фагоцитоз макрофагами частиц опсонизированного латекса, участвует в образовании тиреоидных гормонов и агрегации тромбоцитов, стимулирует выброс гистамина их тучных клеток, адгезию лейкоцитов к эндотелию и эндоцитоз эндотелиальных клеток. Кроме этого, установлено, что перекись водорода в малых дозах вызывает гидролиз инозитол-фосфолипидов с последующей активацией протеинкиназы C, активируя различные фосфолипазы.

Одним из наиболее значимых изменений в мембранных структурах при ПОЛ является окисление тиоловых групп мембранных белков, которое способствует появлению дефектов в липидном слое мембран клеток и митохондрий. В свою очередь, это приводит к увеличению проницаемости биомембран, что становится причиной неконтролируемого проникновения внутрь клетки либо выхода из неё в межклеточное пространство различных ионов, необходимых для поддержания жизнедеятельности клетки, таких как натрий и калий, что приводит к нарушению осмотического давления. Изменение в осмолярности межклеточного пространства вследствие оксидативного стресса и перекисного окисления липидов является серьёзной угрозой гомеостазу не только отдельной клетки, но и организма в целом, сопровождаясь комплексом ответных реакций, именуемых осмотическим стрессом. Важное место в патологическом процессе отводится инаktivации ион-транспортных ферментов, в активный центр которых входят тиоловые группы, Ca^{2+} -АТФазы. Инаktivация этого фермента способствует замедлению выхода ионов Ca^{2+} из клетки и увеличению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , приводя к её повреждению.

Ранее нами было найдено, что у больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей в ответ на острое холодовое воздействие наблюдается нарастание концентрации активных форм кислорода в конденсате выдыхаемого воздуха, продуктов перекисного окисления липидов и ослабление антиоксидантной защиты организма, приводящих к развитию дисбаланса в прооксидантно-антиоксидантной системе (Н.М. Федосеева и др., 2008; Н.М. Горячина и др., 2010; Н.М. Смирнова и др., 2012; А.Б. Пирогов и др., 2014; J.M. Perelman et al., 2011). Роль и участие процессов свободнорадикального окисления, а также одного из его последствий - ПОЛ - в механизме запуска осмотических реакций не до конца определены, тогда как влажность воздуха является важным физическим параметром, оказывающим прямое действие на функционирование респираторного тракта.

5.2. Исследование биомаркеров оксидативного стресса

Оценка характера воспаления важна для ранней диагностики, определения тяжести течения, эффективности противовоспалительной терапии при бронхиальной астме. Клинические симптомы этого заболевания не отражают выраженность воспаления из-за различного субъективного восприятия больными своего заболевания и "маскирующего" эффекта бронхолитиков.

Золотым стандартом оценки воспаления дыхательных путей считается изучение лаважной жидкости и биопсийного материала при бронхоскопическом исследовании, что достаточно травматично для пациента и лимитирует их использование (Э.Х. Анаев, А.Г. Чучалин, 2002; Э.Х. Анаев и др., 2005; F.J.Kelly, 2003; A. Antczak et al., 2011). В настоящее время исследования индуцированной мокроты (ИМ) и конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) являются наиболее приемлемыми для получения образцов из нижних отделов дыхательных путей вследствие простоты получения биологического материала (И.Д. Дугарова и др., 2010; S.A. Kharitonov, P.J. Barnes, 2001; G.M. Mutlu et al., 2001; R.A. Dweik, A. Amann, 2008; B. Antus, 2016).

Анализ КВВ – один из немногих доступных неинвазивных способов диагностики, контроля оценки воспаления и модулирования терапевтического вмешательства. Макромолекулы, входящие в состав жидкости, выстилающей дыхательные пути, составляют первую линию защиты от оксидантов окружающей среды, поступающих с вдыхаемым воздухом (табачный дым, озон, окислы азота), аллергенов, микробной и бактериальной инфекции. Качественные и количественные характеристики этих соединений отражают повреждение дыхательных путей, воспалительные изменения, эффект лечения и могут использоваться для отслеживания динамики течения лёгочных заболеваний (А.Д. Таганович, 2002).

Выдыхаемый воздух и конденсат выдыхаемого воздуха содержат множество биомаркеров в ультранизких концентрациях. Современные методики позволяют определить до 1000 субстанций в дыха-

тельных путях человека (Э.Х. Анаев и др., 2005; М.Д. Алякринская, 2007; И.Д. Дугарова и др., 2010; M. Corradi et al., 2003; P.P. Rosias et al., 2004; P.G. Van Hoydonck et al., 2004; W.M. Brooks et al., 2006; R.A. Dweik, A. Amann, 2008; К.О. Zamuruyev et al., 2016). Исследования сконцентрированы на изучении уровня цитокинов, эйкозаноидов, оксида азота и продуктов его расщепления, пероксида водорода, метаболитов архидоновой кислоты, микроэлементов. Большая часть биологических субстанций может быть получена из всех отделов респираторного тракта, включая и носовые ходы. Предотвращение смешивания выдыхаемого воздуха является важным шагом к получению правильного образца.

Количество аэрозоля, формирующегося в дыхательных путях при выдохе, разнится для каждого пациента и зависит от ряда факторов (респираторного теплообмена, объёма вентилируемого воздуха, скорости воздушного потока, поверхностного натяжения внеклеточной выстилки и т.д.). Чем выше скорость потока и меньше поверхностное натяжение, тем больше продукция аэрозолей. Баланс между низкой скоростью и высоким поверхностным натяжением, который обнаруживается на уровне альвеол, определяет продукцию аэрозоля. Турбулентные потоки облегчают формирование аэрозоля. Минутная вентиляция остаётся основным определяющим фактором количества конденсата, получаемого за единицу времени, по некоторым данным не влияя на концентрацию измеряемых биологических субстанций, за исключением H_2O_2 , который существенно зависит от потока вентилируемого воздуха (M.B. Schleiss et al., 2000; E. Marek et al., 2009; R. Gajdosi et al., 2011).

Наибольший интерес представляет изучение маркеров свободно-радикального окисления, в частности пероксида водорода, продуктов перекисного окисления липидов, поскольку некоторые из них могут являться потенциальными свидетелями и участниками воспаления в лёгких, запуская ряд цепных молекулярных реакций с продукцией большого спектра цитокинов.

Основные требования при сборе КВВ

Процесс сбора КВВ для исследования перекисного окисления липидов может быть осуществлён различными способами, например, используя аппарат ECoScreen Turbo (VIASUS Healthcare GmbH, Германия), в котором через одноразовый дыхательный контур вдыхается воздух из окружающей атмосферы, а выдох осуществляется в устройство, конденсирующее пары выдыхаемого воздуха при температуре -20°C (И.А. Климанов и др., 2006). Сохранение низкой температуры в период сбора конденсата важно, поскольку это препятствует разрушению некоторых летучих соединений и других биологических маркеров воспаления, таких как пероксид водорода, 8-изопростан, лейкотриены и т.д. Во избежание влияния циркадных ритмов исследование выполняется в утренние часы, через 1,5-2 часа после лёгкого завтрака.

С целью исключения контаминации слюной образца перед процедурой пациент двукратно ополаскивает ротовую полость дистиллированной водой, после чего присоединяется к мундштуку, плотно обхватив его губами и в течение 20 минут при спокойном произвольном дыхании вентилирует воздух, носовое дыхание исключается путём наложения носового зажима.

Для стандартизации забора биологического материала используется таймер. Пациент предупреждается о необходимости отсоединения от прибора в случае позывов к кашлю, повышенного слюноотделения. Исследование возобновляется после исчезновения причины. В случае появления симптомов затруднения дыхания процедура прекращается. После окончания установленного для сбора КВВ времени колба с биологическим материалом немедленно извлекается из аппарата и закрывается крышкой.

После оттаивания жидкий конденсат изымается при помощи стерильного одноразового шприца, немедленно помещается в морозильную камеру при температуре -70°C, где хранится до проведения биохимических исследований. Перед анализом микропробирки с об-

разцами КВВ энергично встряхивают на вортексе (И.А. Климанов и др., 2006; J.V. McCafferty et al., 2004; I. Horváth et al., 2005).

Метод оценки H_2O_2 в КВВ

Содержание пероксида водорода в КВВ определяется электрохимическим методом с помощью биоанализатора БИО 3. В качестве сенсора в приборе используют электроды на основе берлинской лазури, которая является высокоэффективным электрокатализатором восстановления пероксида водорода.

Метод экстракции липидов из КВВ

В настоящее время методы оценки содержания продуктов перекисного окисления липидов в липидных экстрактах заключаются в измерении величины поглощения в ультрафиолетовой области спектра (R.S. Kim, F.S. LaBella, 1987; B. Palmiery, V. Sblendorio, 2007). В оригинальной методике экстракция липидов из образца КВВ проводится в соотношении гептана: изопропанола 1:1. Измерение оптической плотности гептана и изопропанола фаз экстрактов осуществляется при длинах волн 220 нм, 232 нм и 278 нм, что позволяет оценить содержание недоокисленных липидов (E220), конъюгированных диенов (E232), конъюгированных триенов и кетодиенов (E278) в относительных величинах и вычислить два показателя окисления липидов: E232/E220 и E278/E220.

Ряд авторов также предлагают измерение оптической плотности субстрата при длине волны 400 нм, относя его к основаниям Шиффа. Оригинальный способ не предусматривает регистрацию поглощения спектров экстрактов липидов и ограничивает измерения оптической плотности при фиксированных вышеназванных длинах волн. Не ясно, как липиды КВВ распределяются между фазами гептана и изопропанола. Очевидно, что фаза изопропанола содержит воду из КВВ, что может влиять на поглощение в УФ-области спектра.

Существует два классических метода экстракции липидов из биоматериала, предложенные J. Folch et al. (1957) и E.G. Bligh,

W.J. Dyer (1959). В первом липиды экстрагируют смесью хлороформ: метанола 2:1, а во втором со смесью хлороформ: метанол 1:2.

Метод Bligh-Dyer является предпочтительным для экстракции липидов из образцов с высоким содержанием воды. В модифицированной методике (Е.А. Бородин, М.И. Штарберг, 2015; E.A. Borodin et al., 2015) липиды экстрагируют из образцов КВВ, соединяют 3 мл хлороформа с метанолом в соотношении 1:2 (об/об), затем смесь добавляют к 0,4 мл биологического материала КВВ и с перерывами в течение последующих 10 мин получившийся раствор продолжают смешивать. Затем добавляют 1,5 мл дистиллированной воды. Смесь интенсивно перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Хлороформную фазу собирают и немедленно выпаривают на роторном испарителе при пониженном давлении. Сухой остаток на стенках конуса растворяют в 3 мл этанола и хранят в холодильнике до проведения спектрального анализа. Содержание в КВВ продуктов перекисного окисления липидов - конъюгированных диенов и триенов (кетодиенов) - исследуют по ультрафиолетовым спектрам поглощения липидных экстрактов, регистрацию которых проводят на спектрофотометре (например, Unicо 2804) по двухлучевой схеме в диапазоне длин волн 200-500 нм против этанола.

Спектры поглощения липидных экстрактов из КВВ

На рис. 38 (а) показан спектр поглощения липидного экстракта из КВВ у больного бронхиальной астмой, содержащего окисленные липиды. В спектре имеются два пика поглощения при 207 и 291 нм и плечо на основном пике около 229 нм.

Полученные результаты соответствуют общепринятым представлениям о том, что появление конъюгированных двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах приводит к смещению максимума поглощения в сторону более длинных волн. Диеновые конъюгаты показывают максимум поглощения при длине волны 232-233 нм, в то время как конъюгированные триены и кетодиены при 278 нм (R.S. Kim, F.S. LaBella, 1987). Спектр поглощения окисленного поли-

ена соевого фосфатидилхолина (EPL-вещества, хранящегося в морозильной камере в течение более 30 лет) подтверждает эту мысль и показывает три различных пика поглощения при 206, 232 и 278 нм (рис. 38 (б)).

Основной пик поглощения происходит при длине волны 207 нм, что, скорее всего, соответствует неокисленным липидам. Не совсем понятно, почему в оригинальной методике (R.S. Kim, F.S. LaBella, 1987; B.S. Khyshiktuev et al., 1996) содержание неокисленных липидов оценивалось по поглощению при длине волны 220 нм?

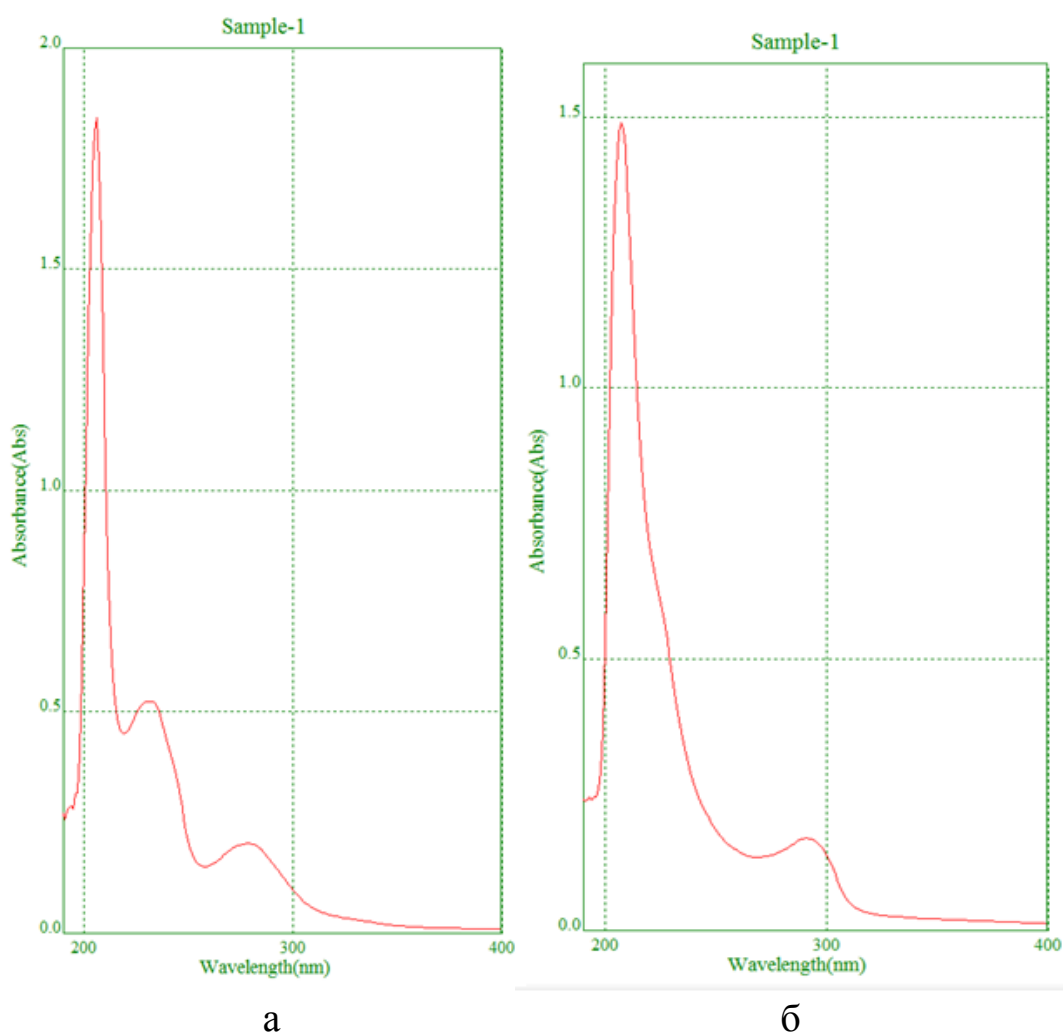


Рис. 38. Спектры поглощения липидных экстрактов из КВВу больных бронхиальной астмой (а) и соевого фосфатидилхолина (б) (Е.А. Vorodin et al., 2015).

Согласно результатам Е.А. Vorodin et al. (2015), поглощение при длине волны 220 нм более чем в 2 раза ниже по сравнению с погло-

щением при 207 нм - 0,66 и 1,49 единиц оптической плотности, соответственно (рис. 39). Максимум пика колеблется в различных спектрах КВВ липидного экстракта в пределах 201-207 нм, поэтому трудно выбрать определённую длину волны, которая будет характерна для неокисленных липидов. Как видно из рис. 39, максимумы поглощения липидных экстрактов в трёх различных образцах КВВ соответствуют 203, 206 и 207 нм. Весьма вероятно, что сдвиг максимума в сторону более длинных волн связан с окислением липидов, поэтому сознательно был сделан выбор в пользу 206 нм.

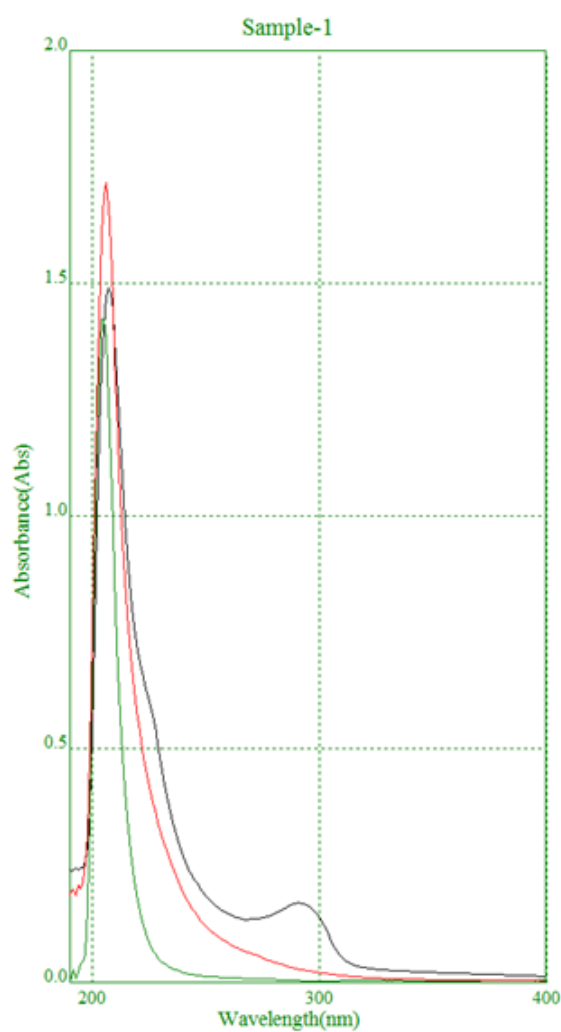


Рис. 39. Спектры поглощения липидных экстрактов из КВВ у здоровых лиц (зеленый и красный) и больных астмой (чёрный) (Е.А. Vorodin et al., 2015).

Таким образом, чтобы оценить степень перекисного окисления липидов в образцах конденсата выдыхаемого воздуха следует исполь-

зовать 5 индексов: E206 - неокисленные липиды, E233 - сопряженные диены, E278 - сопряженные триены и кетодиены, E233/E206 соотношение - оптической плотности диеновых конъюгатов к неокисленным липидам и E278/E206 - отношение оптической плотности сопряженных триенов и кетодиенов к поглощению недоокисленных липидов. Поглощение при длине волны 400 нм, как правило, соответствует базовой линии, поэтому представляется невозможным оценить содержание оснований Шиффа.

Содержание диеновых конъюгатов в конденсате выдыхаемого воздуха может быть вычислено в нмоль/мл с учётом разбавления в процессе экстракции субстрата и молярного коэффициента экстинкции для диеновых конъюгатов $0,22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Важно подчеркнуть, что содержание липидов в образцах КВВ существенно меняется, как это следует из значений оптической плотности при 206 нм, которые могут варьироваться в пределах 0,1-2,0 в анализируемых образцах.

Метод экстракции липидов и продуктов антиоксидантной системы из сыворотки крови

Малоновый диальдегид определяют в сыворотке крови по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой. К 1 мл образца добавляют 1 мл 30% трихлоруксусной кислоты и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Затем, в полученный надосадок вливается 1 мл 0,8% тиобарбитуровой кислоты, и пробирку устанавливают на кипящую водяную баню на 15 мин. По окончании инкубации охлаждают, добавляют 1 мл хлороформа и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин. для удаления мутности. Верхнюю окрашенную фазу осторожно переносят в кювету, и измеряют светопоглощение при длине волны 532 нм. При подсчёте содержания малонового диальдегида в пробе используют коэффициент мольной экстинкции $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Содержание малонового диальдегида в сыворотке крови выражают в нмоль/мл.

Количество диеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов в сыворотке крови определяют в хлороформной фазе липидного экс-

тракта. Приготовление липидного экстракта заключается в следующем: в центрифужные пробирки вносят 1 мл сыворотки крови, добавляют 3,75 мл смеси хлороформ:метанол (1:2), перемешивают. Экстрагируют 1 час, периодически перемешивая. Центрифугируют 5 мин. при 3000 об/мин. Надосадки сливают в центрифужные пробирки, размещают в холодильник. К осадку добавляют 4,75 мл смеси хлороформ:метанол:вода (1:2:0,8), перемешивают. Экстрагируют в течение 1 часа, периодически перемешивая, центрифугируют 5 мин., надосадки объединяют. К ним прибавляют 2,5 мл воды и 2,5 мл хлороформа, перемешивают и центрифугируют 15 мин. до полного расслоения. Нижнюю, хлороформенную фазу, содержащую липиды, переносят в колбу и упаривают на ротаторном испарителе. Сухой остаток растворяют в 1,5 мл этанола. Диеновые конъюгаты измеряют в 0,1 мл липидного экстракта, который вносят в кювету спектрофотометра, где находится 2,9 мл абсолютного спирта. Оптическую плотность измеряют при длине волны 233 нм с ходом луча 10 мм. В расчёте используют коэффициент мольной экстинкции $2,2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Величину ДК в сыворотке крови выражают в нмоль/мл.

Количество гидроперекисей липидов определяют по их способности окислять ионы Fe^{2+} с последующей реакцией на Fe^{3+} с тиоцианатом аммония. К 1 мл раствора липидов в этаноле последовательно добавляют 1,7 мл этанола, 0,2 мл 3% HCl на этаноле, 0,1 мл 0,17% раствора $\text{Fe}_4(\text{NH}_2\text{SO}_4) \times 6\text{H}_2\text{O}$ на 3% HCl в этаноле, перемешивают, через 30 секунд добавляют 0,1 мл 20% раствора NH_4CNS . Оптическую плотность проб измеряют через 15 мин. при длине волны 490 нм относительно раствора сравнения, который вместо экстракта содержит 1 мл абсолютного этилового спирта. С целью пересчёта содержания гидроперекисей липидов в мольные концентрации строят калибровочную кривую для определения ионов Fe^{3+} по реакции с NH_4CNS ; считается, что ионы Fe^{2+} вступают в реакцию с гидроперекисями в эквимольных количествах: $\text{ROOH} + \text{Fe}^{2+} \text{ -----} > \text{RO}^* + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}$. Коэффициент мольной экстинкции образующегося цветного комплекса $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CNS})]_6$ при 490 нм составляет $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, а в расчёте на

ион Fe^{3+} $0,55 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Величину гидроперекисей в сыворотке крови выражают в нмоль/мл.

Содержание витамина Е определяют в липидных экстрактах из сыворотки крови по цветной реакции с дипиридиллом и FeCl_3 . К аликвоте раствора липидов в этаноле добавляют этанол до общего объёма 2 мл и далее последовательно вносят 0,2 мл хлороформа, 0,2 мл 0,2% раствора дипиридила в этаноле, 0,2 мл 0,2% раствора FeCl_3 в этаноле и сразу же измеряют поглощение проб при 540 нм в кювете толщиной 0,5 см. Содержание витамина Е рассчитывают по калибровочному графику (Р.Ж. Кисилевич, С.И. Скварко, 1972).

Содержание церулоплазмина в сыворотке крови оценивают простым колориметрическим методом, разработанным Равином и основанным на окислении р-фенилендиамина при участии церулоплазмина. В пробирку вносят 0,1 мл сыворотки, 8 мл 0,4 М ацетатного буфера, рН 5,5 и 1 мл 0,5% водного раствора солянокислого р-фенилендиамина, тщательно перемешивают и помещают на 1 час в водяную баню при температуре 37°C. Реакцию останавливают добавлением 2 мл 3% раствора фтористого натрия, перемешивают, помещают в холодильник на 30 минут. Пробы колориметрируют в кюветах толщиной 10 мм при длине волны 530 нм, и рассчитывают содержание церулоплазмина. В контрольные пробы фтористый натрий вносят до начала инкубации.

5.3 Динамика показателей перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха у здоровых лиц

По нашим данным, количество собранного конденсата выдыхаемого воздуха существенно варьирует на протяжении трёх дней исследования и в процессе выполнения бронхопровокационных осмотических проб (табл. 24).

В то же время в промежутке одного периода исследования коэффициент вариации для средних значений собранного КВВ не превышал 10-15% (Е.А. Vorodin et al., 2016). После аэрозольных ингаля-

ций дистиллированной воды и гипертонического раствора мы наблюдали уменьшение объема конденсата в большей степени, чем после дозированной физической нагрузки. Продукция КВВ снижалась от 0,5 до 2,0 мл у 42% респондентов после ИДВ и в 58% случаев после ИГР. Как показывают ранее проведенные исследования, существует прямая связь между объемом собранного КВВ и объемом провентилированного человеком воздуха (Е.М. Konstantinidi et al., 2015), что влияет на межсуточные колебания объема собранного КВВ. Однако не совсем понятно, с чем связано снижение его количества после провокационного тестирования.

Таблица 24. Объем (V) собранного КВВ до и после проведения бронхопровокационных проб на протяжении трехдневного обследования (M±m).

Показатель	Проба ИДВ	КВ	Проба ИГР	КВ	Проба ДФН	КВ
V до пробы, мл	4,12±0,09	0,10	3,93±0,09	0,10	3,87±0,07 p ₁ =0,044	0,07
V после пробы, мл	3,82±0,09 p ₂ =0,032	0,11	3,55±0,12 p ₂ =0,042	0,15	3,79±0,11	0,13
ΔV	-0,30±0,16		-0,37±0,13		-0,12±0,12	

Примечание: здесь и далее КВ – коэффициент вариации, p₁ – достоверность различий при пробах ИГР и ДФН, p₂ – достоверность различий показателя в сравнении с базовыми значениями.

В случае использования ингаляции 4,5% раствора NaCl у пациентов наступала кратковременная гиперосмолярность слизистой дыхательных путей с уменьшением продукции жидкости, чего не было в условиях физиологического гиперосмолярного состояния во время ДФН. Также труднообъяснимо значимое уменьшение объема продуцируемой жидкости после пробы ИДВ. Кроме того, доза ингалируемого раствора, доставляемого пациенту во время проведения аэрозольных проб, существенно не влияла на количество собранного в последующем конденсата и не зависела от проходимости дыхательных путей (ОФВ₁) и выраженности реакции на стимул (ΔОФВ₁).

Межсуточная динамика продуктов ПОЛ

Для анализа содержания продуктов перекисного окисления липидов в КВВ по стандарту отбиралось по 0,4 мл полученного биологического материала. Используемый метод регистрации ультрафиолетовых спектров поглощения липидных экстрактов из КВВ позволил нам количественно измерить степень окисления липидов в респираторном тракте. Определяли максимум поглощения диеновых конъюгатов при длине волны 233 нм, конъюгированных триенов и кетодиенов при 278 нм (С. Gessner et al., 2001), содержание неокисленных липидов по максимальному их поглощению при длине волны 206 нм (M.L. Bartoli et al., 2011, E.A. Vorodin et al., 2015), а также отношение поглощения 233 нм к 206 нм (E233/E206) и 278 нм к 206 нм (E278/E206).

Содержание липидов в анализируемых образцах КВВ на протяжении трёх дней исследования менялось (табл. 25). По совокупности представленных значений все выборки имели нормальное (гауссово) распределение.

Таблица 25. Межсуточная динамика базовых показателей перекисного окисления липидов в КВВ перед проведением бронхопровокационных проб ($M \pm m$).

Показатель	Проба ИДВ	КВ	Проба ИГР	КВ	Проба ДФН	КВ
E206 нм	0,11±0,03	0,83	0,16±0,06	0,84	0,20±0,03 p=0,046	0,67
E233 нм	0,017±0,001	0,27	0,034±0,003 p=0,0017	0,23	0,029±0,002 p=0,006	0,23
E278 нм	0 (поглощения нет)	-	0,007±0,001	0,51	0,007±0,001	0,61
E233/E206	0,18±0,02	0,44	0,26±0,08	0,71	0,22±0,03	0,56
E278/E206	-	-	0,06±0,01	0,54	0,05±0,01	0,62

Как следует из значений оптической плотности при 206 нм, показатель определялся в достаточно широком диапазоне, варьируя в

интервале 0,1-0,9, при 233 нм - в интервале 0,01-0,05, при 278 нм – в интервале 0,001-0,02. Мы оценили степень разброса и относительную изменчивость средних величин полученных значений по коэффициенту вариации каждого из представленных показателей. Менее вариабельным из определяемых параметров был E233, его отклонение от средней величины в группе на протяжении исследуемых дней составляло 23-27%.

Прослеживалась чёткая тенденция к увеличению содержания продуктов перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха с достоверным увеличением уровня неокисленных липидов и диеновых конъюгатов в процессе трёхдневного тестирования испытуемых. Вполне допустимо, что это могло быть связано с разным количеством собранного биологического материала вследствие неравномерности паттерна дыхания (поверхностное или более глубокое дыхание), поскольку испытуемые вентилировали воздух в произвольной форме, только вводилось ограничение по времени. Как показали проведённые ранее исследования, у здоровых лиц концентрация летучих соединений в КВВ, в частности H_2O_2 , меняется при изменении паттерна дыхания (I. Horváth et al., 2005; E. Marek et al., 2008; R. Gajdocsi et al., 2011).

С одной стороны, в нашем исследовании объем собранного конденсата выдыхаемого воздуха в трехдневном промежутке существенно различался, в то же время мы не нашли какой либо связи между количеством собранного КВВ и основными параметрами вентиляционной функции легких. Об этом же свидетельствуют работы С. Gessner et al. (2001), J. Vaughan et al. (2003), J.B. McCafferty et al. (2004), в которых показано, что несмотря на важность в определении объема КВВ таких составляющих как минутная вентиляция и глубина дыхания, дыхательный паттерн существенным образом не влияет на pH, уровень содержания протеинов, концентрацию нитритов, лейкотриенов и малонового альдегида. С другой стороны, динамика в продукции ПОЛ могла быть следствием проведенных накануне бронхопровокационных проб.

Окислительная модификация липидов дыхательных путей после применения осмотических стимулов

На рис. 40 показаны графики поглощения липидных экстрактов КВВ до и после проведения бронхопровокационных проб с осмотическими стимулами. Для гиперосмолярных стимулов (ингаляции 4,5% раствора NaCl и дозированная физическая нагрузка) было характерным снижение содержания E206 на 20 и 30% после пробы, тогда как в ответ на гипоосмолярный стимул (ингаляцию дистиллированной водой) отмечался его прирост на 25%, однако, вследствие высокого индивидуального разброса показателя среднегрупповые значения не достигали достоверных различий.

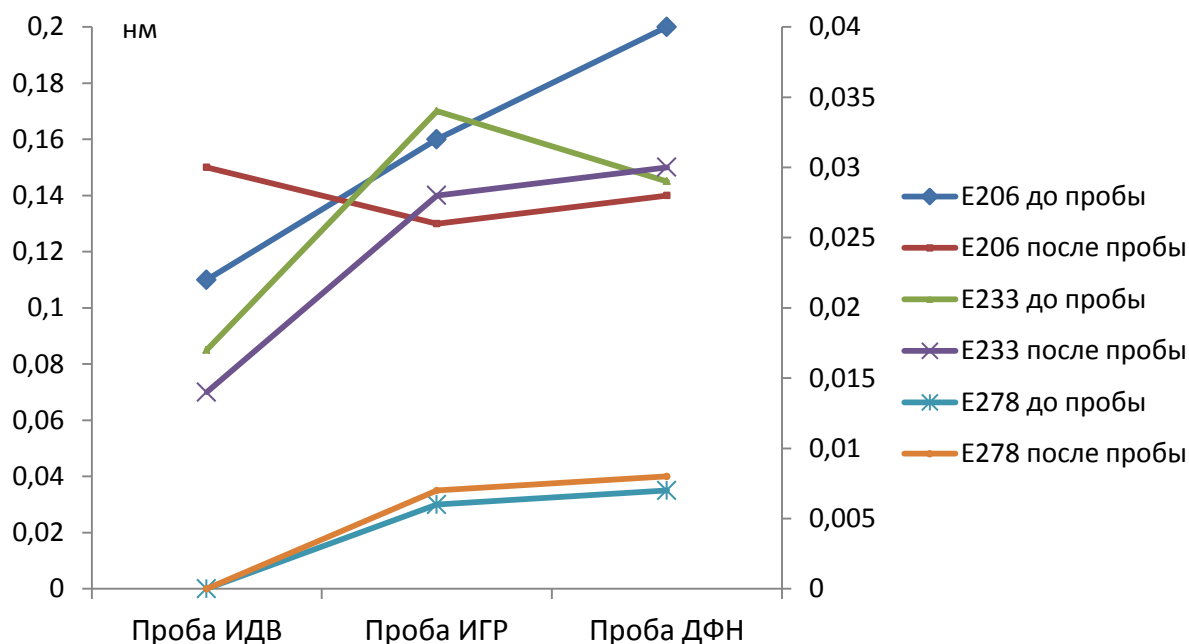


Рис. 40. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в КВВ.

Оценивая продукцию диеновых конъюгатов после проведения проб, мы наблюдали тенденцию к снижению E233 в большей степени в ответ на аэрозольные пробы (ИДВ и ИГР), чем после выполнения дозированной физической нагрузки: в среднем по группе уровень E233 составил $0,014 \pm 0,002$ и $0,028 \pm 0,005$, $0,030 \pm 0,002$, соответственно. Обращают на себя внимание более высокие значения этого пока-

зателя как до, так и после тестирования на гиперосмолярные триггеры, по отношению к пробе ИДВ ($p=0,039$; $0,009$). Поглощение E278 после провокации оставалось на прежнем уровне.

Взаимосвязь между содержанием ПОЛ в конденсате выдыхаемого воздуха и проходимость дыхательных путей

На протяжении трёх дней исследования прослеживалась вариативность абсолютной величины $ОФВ_1$ в пределах 160 мл, что немного превышало суточный диапазон воспроизводимости, принятой для данного значения (150 мл) (рис. 41). В ответ на проведение аэрозольных проб в среднем по группе регистрировалось снижение $ОФВ_1$ с более значимыми изменениями в ответ на ингаляцию дистиллированной воды, тогда как в ответ на дозированную физическую нагрузку отмечался несущественный прирост показателя.

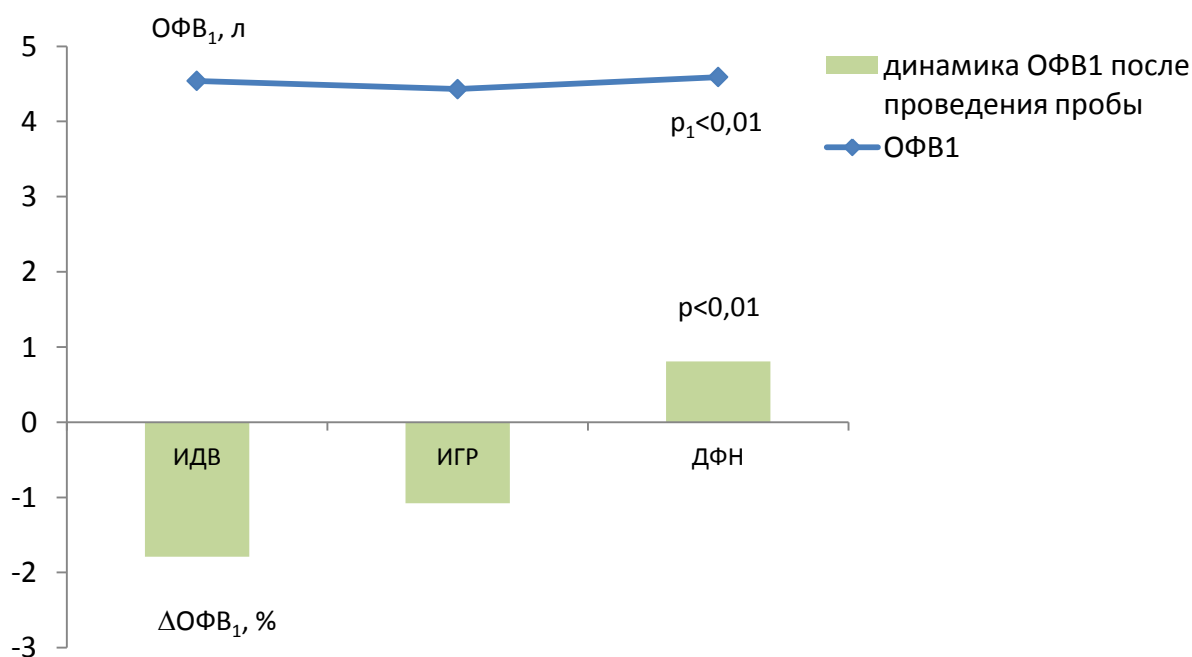


Рис. 41. Межсуточные значения базового $ОФВ_1$ и его динамика в ответ на бронхопровокационные пробы.

Не было найдено тесной взаимосвязи между показателями перекисного окисления липидов, измеренными непосредственно перед те-

стированием, и параметрами «поток-объем» форсированного выдоха, характеризующими бронхиальную проходимость.

В то же время, исходное значение $ОФВ_1$, зарегистрированное перед провокацией, было тесно связано с содержанием неокисленных липидов в конденсате выдыхаемого воздуха после проведения пробы ИДВ ($ОФВ_1$ и E206 $r=-0,81$; $p=0,003$) и соотношением E206/E233 при пробе ИГР ($ОФВ_1$ и E233/E206 $r=-0,73$; $p=0,042$). Существенно, что в пробе с дозированной физической нагрузкой продукция E233 и E278 после тестирования в большей степени зависела от выполненной во время теста нагрузки ($r=0,65$; $p=0,006$ и $r=0,62$; $p=0,01$, соответственно), чем от исходной проходимости дыхательных путей. В то же время обнаружена достоверная корреляция между динамикой $ОФВ_1$ ($\Delta ОФВ_1$) в ответ на дозированную физическую нагрузку и возникающими изменениями в продукции диеновых конъюгатов ($r=-0,57$; $p=0,021$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что осмотические стимулы могут модулировать уровень ПОЛ у здоровых субъектов и играть важную роль в адаптации дыхательных путей.

5.4. Роль оксидативного стресса в реакции дыхательных путей на гипоосмолярный стимул у больных бронхиальной астмой

Осмотический стресс, возникающий в респираторном тракте под действием гипоосмолярности (вдыхание водяных паров) вследствие неблагоприятных погодных явлений (дождь, туман, наводнение и т.д.) усугубляет течение бронхиальной астмы (Ю.Ю. Хижняк и др., 2009). Ранее нами показана высокая распространённость гиперреактивности дыхательных путей на ингаляцию дистиллированной воды у больных хроническими обструктивными болезнями органов дыхания (А.Г. Приходько и др., 2005, 2011, 2014). Как было указано выше, происходящие в осмолярной рецепции изменения связывают как с чрезмерной активностью осмочувствительных нейронов, так и с ме-

ханическим набуханием ткани, сопровождающимся нарушением в электрохимическом градиенте (Н. Mochizuki et al., 2002). Недостаточно исследованы взаимоотношения между осмотической реактивностью дыхательных путей и оксидативным стрессом. Поскольку пероксид водорода и ПОЛ – одни из основных маркеров активности воспалительного процесса в легких, нами была предпринята попытка оценить уровень оксидативного стресса в КВВ и сыворотке крови у лиц с осмотической гиперреактивностью дыхательных путей и степень его влияния на проходимость дыхательных путей у больных бронхиальной астмой.

Исследуя характер оксидативного стресса в дыхательных путях по эндогенной продукции H_2O_2 и продуктам перекисного окисления липидов в КВВ нами было найдено существенное превышение базового уровня H_2O_2 , диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряжённых триенов у больных бронхиальной астмой по отношению к здоровым лицам (рис. 42). У пациентов, реагировавших на осмотический стимул, наблюдались достоверно более высокие значения продукции диеновых конъюгатов в КВВ по сравнению с больными, не имевшими реакции на стимул. Баланс соотношения первичных продуктов перекисного окисления липидов (кутодиенов) к общему содержанию липидов в КВВ существенно влиял на выраженность реакции периферических бронхов на ИДВ, оцениваемую по степени падения MOC_{50} ($r=0,60$; $p<0,05$), и зависел от количества циркулирующих эритроцитов в плазме крови ($r=-0,69$; $p<0,05$).

При исследовании продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови у пациентов с гиперреактивностью бронхов на ингаляцию дистиллированной воды было обнаружено двукратное увеличение первичного метаболита - гидроперекиси липидов - при низком содержании у них диеновых конъюгатов и одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида - по сравнению больными, не имевшими реакции на стимул, что свидетельствовало о происходящих изменениях в процессе пероксидации (рис. 43). Кроме того, у этих больных была найдена тесная связь по-

вышенного образования гидроперекиси липидов и малонового диальдегида в крови с реакцией бронхов ($\Delta\text{ОФВ}_1$) на гипоосмолярный стимул ($r=-0,65$, $p<0,05$ и $r=-0,70$, $p<0,05$, соответственно).

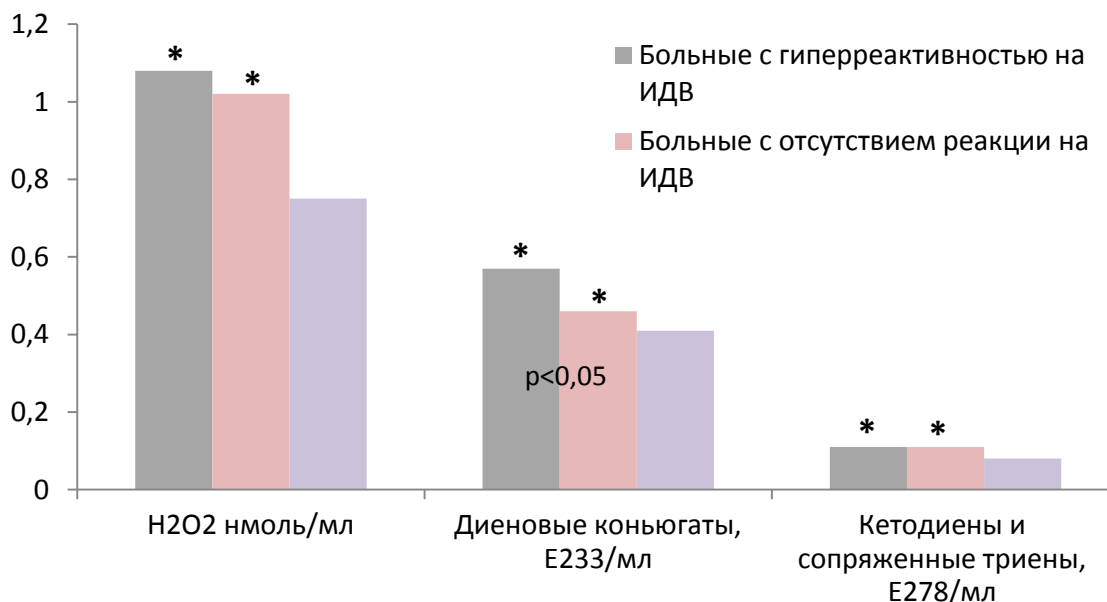


Рис. 42. Сравнительная характеристика показателей оксидативного стресса в КВВ (здесь и далее * - достоверность различий показателя в сравнении со здоровыми лицами; p – достоверность различий между больными с положительной и отрицательной реакцией на ИДВ).

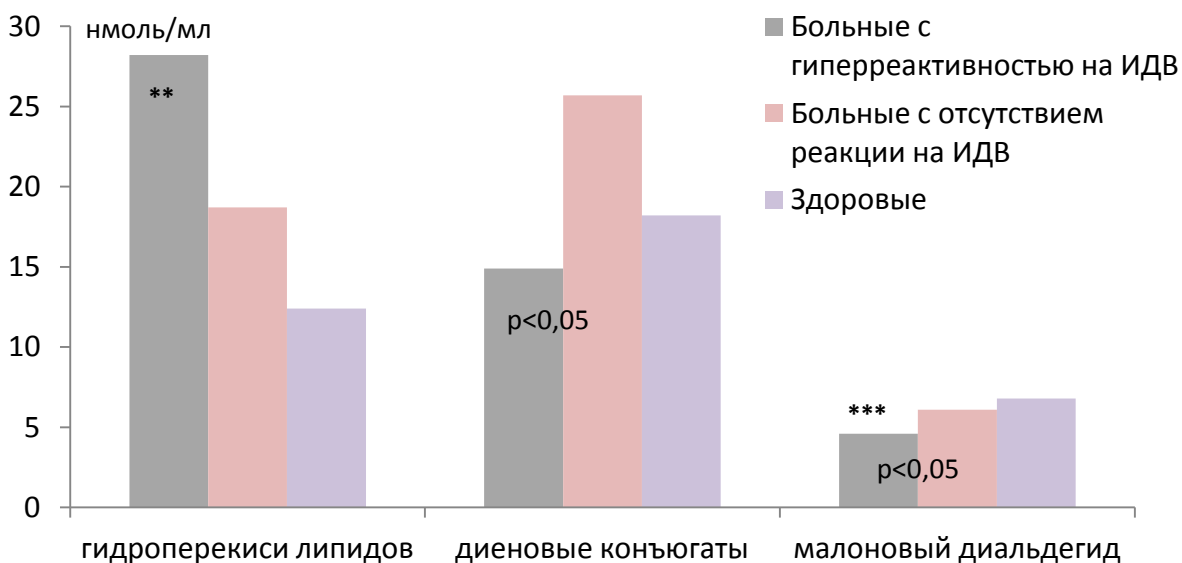


Рис. 43. Сравнительная характеристика показателей оксидативного стресса в сыворотке крови.

Ранее было установлено, что экологически неблагоприятные факторы окружающей среды влекут за собой повышенное образование свободных радикалов в организме. Обладая очень высокой реакционной способностью, они оказывают повреждающее действие на клеточные структуры, прежде всего органов дыхания. Нет сомнений в том, что оксидативный стресс – раннее ключевое событие при обструктивных заболеваниях легких.

Нами было найдено существенное увеличение продукции пероксида водорода у астматиков. Под действием экзогенных и при непосредственном участии эндогенных факторов происходит усиленная генерация активных форм кислорода фагоцитирующими клетками, которые посредством супероксиддисмутазы или при спонтанной дисмутации преобразуются в H_2O_2 . Последний, в совокупности с другими сильными окислителями, приводит к повреждению белковых, липидных структур клеток, нуклеиновых кислот, появлению у них антигенных свойств, хемоаттрактантов, с привлечением фагоцитирующих клеток в очаг воспаления, формируя «порочный круг» (С.К. Соодаева, 2012).

При чрезмерном накоплении активных форм кислорода, пероксидов и их метаболитов возникает оксидативный стресс, инициирующий бронхоспастический синдром. Ранее нами показано, что интенсификация свободнорадикального окисления является одним из важных механизмов возникновения бронхоконстрикторной реакции на холод (Н.М. Федосеева, Ю.М. Перельман, 2008; Н.М. Горячкина и др., 2010; 2011; J.M. Perelman et al., 2011).

Избыточная активация процессов цепного свободно-радикального окисления липидов приводит к накоплению в тканях таких недоокисленных продуктов, как липоперекиси, радикалы жирных кислот, кетоны, альдегиды, кетокислоты, что, в свою очередь, влечет за собой повреждение и увеличение проницаемости клеточных мембран, окислительную модификацию структурных белков, ферментов, биологически активных веществ. Нами был найден более высокий уровень первичных метаболитов в КВВ и сыворотке крови у

больных с выраженной бронхоконстрикторной реакцией на ингаляцию дистиллированной воды.

Окисление тиоловых групп мембранных белков при ПОЛ способствует появлению дефектов в липидном слое мембран клеток и митохондрий. Это приводит к увеличению проницаемости биомембран и сопровождается неконтролируемым выходом из клетки различных ионов. В частности, гипоосмолярное состояние в дыхательных путях приводит к увеличению секреции ионов калия в межклеточную среду, стимулирует выделение нервными окончаниями блуждающего нерва ацетилхолина, тем самым повышая реактивность бронхов (R.M. Effros et al., 2002).

Нами не обнаружено тесной связи между повышенным содержанием пероксида водорода в КВВ и выраженностью реакции бронхов на ингаляцию дистиллированной воды у осмочувствительных лиц, однако уровень образующихся в процессе перекисного окисления липидов первичных метаболитов в выдыхаемом воздухе существенно влиял на транзиторное сужение мелких дыхательных путей. Скорее, это указывало на интенсивность реакции и её местоположение в пределах респираторного тракта, а также клиническую тяжесть формирующегося бронхоспазма, участниками которого могут являться и другие биохимические маркеры воспаления, о чем будет сказано далее. Вполне допустимо, что у высокочувствительных к гипотоническому раствору больных бронхиальной астмой происходит дополнительное нарушение осмолярности, которое способно изменить каскад молекулярных реакций, усиливая активность клеточного воспаления либо ускоряя происходящие процессы. Как известно, реактивные формы кислорода самостоятельно или через продукты перекисного окисления липидов посредством активации киназ могут увеличивать секрецию мощного хемоаттрактанта нейтрофилов IL-8 и TNF- α (I. Rahman, I.M. Adcock, 2006). Для TNF- α образование активных форм кислорода является одним из ключевых моментов в проявлении цитотоксического действия, что, в свою очередь, имеет существенное значение в развитии апоптоза клеток.

5.5. Роль пероксида водорода и цитокинов в формировании воспалительного паттерна у больных бронхиальной астмой с изолированной и сочетанной реакцией дыхательных путей на гипоосмотический и холодовой стимулы

Если механизмы трансдукции холодового стимула в дыхательных путях, опосредуемые холод- и ментолчувствительными рецепторами TRPM8 (A.S. Sabnis et al., 2008; M.C. Li et al., 2011) и участие последних в формировании холодовой гиперреактивности дыхательных путей (Д.Е. Наумов и др., 2012) доказаны, то путь формирования избыточной реакции бронхов на воздействие осмотических (влажностных) стимулов, несмотря на широту фармакологической и молекулярной информации, все же носит предположительный характер. Клинические проявления данного патофизиологического феномена слабо выражены, тогда как его возникновение может существенным образом изменить течение бронхиальной астмы (А.Г. Приходько и др., 2005, 2011). Кроме того, специфичность существующих реакций для некоторых пациентов подводит к выводу о существовании отдельных фенотипов, связанных с особенностями воспаления.

Нами исследованы признаки воспаления в респираторном тракте и сыворотке крови у 122 больных бронхиальной астмой, распределенных на группы (рис. 44) по различиями в реакции на холодовой и осмотический триггеры: 1 группа – с гиперреактивностью дыхательных путей на оба стимула (холодовой и осмотический); с высокой чувствительностью бронхов только на ингаляцию дистиллированной воды (2 группа); с гиперреактивностью только на изокапническую гипервентиляцию холодным воздухом (3 группа); с отсутствием реакции на оба триггера (4 группа).

Анализируя образование H_2O_2 и уровень ПОЛ в КВВ, мы наблюдали высокую эндогенную продукцию пероксида водорода у пациентов 1 группы, по отношению к остальным группам (рис. 45). У этих больных концентрация H_2O_2 в 1,4 раза превышала значения, полученные у лиц с изолированной реакцией на дистиллированную во-

ду, в сочетании с относительно низким образованием диеновых конъюгатов. Аналогичная тенденция прослеживалась и у лиц 3 группы.

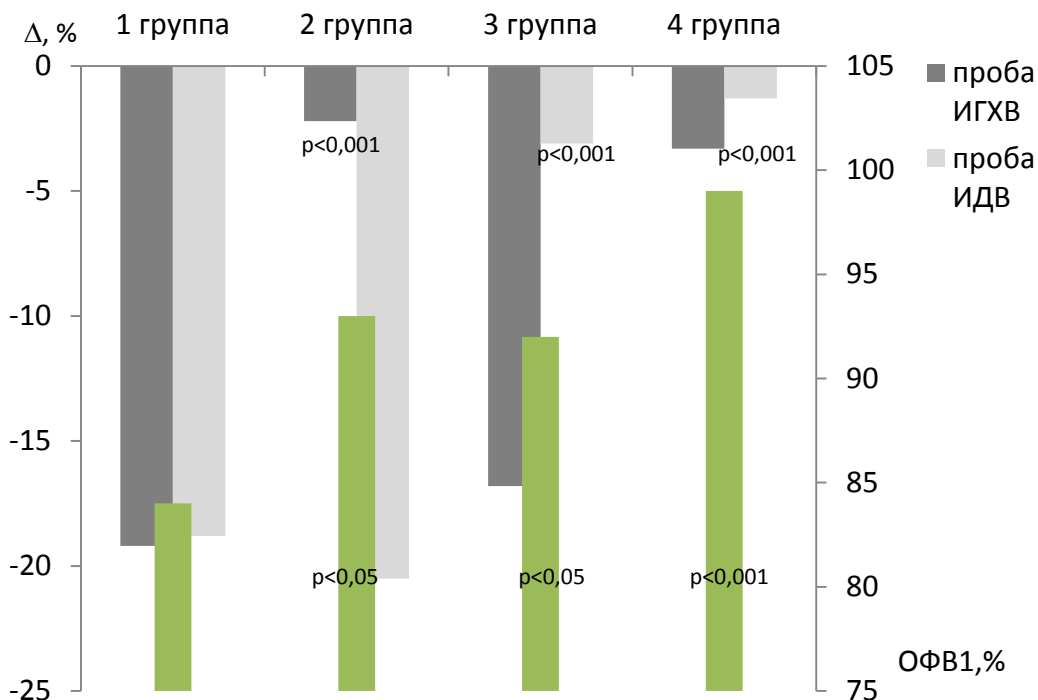


Рис. 44. Внутригрупповые различия в реакции на бронхопровокационные стимулы (р - достоверность различий в сравнении с 1 группой).

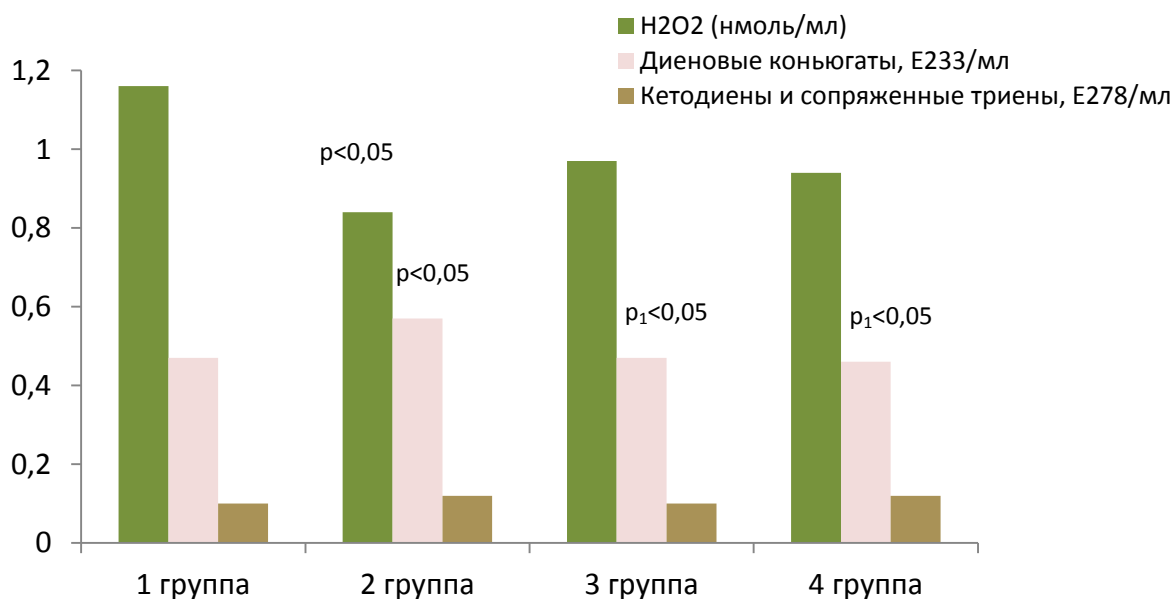


Рис. 45. Сравнительная характеристика показателей ОС в конденсате выдыхаемого воздуха (р - достоверность различий в сравнении с 1 группой; р₁ - в сравнении со 2 группой).

Исследован базовый профиль цитокинов в сыворотке крови и в КВВ (рис. 46). Наиболее яркие изменения найдены при исследовании IL-5, концентрация которого в сыворотке крови у больных 1 группы и больных с изолированной реакцией к холодному воздуху была более чем в 2 раза выше, чем во 2 и 4 группах.

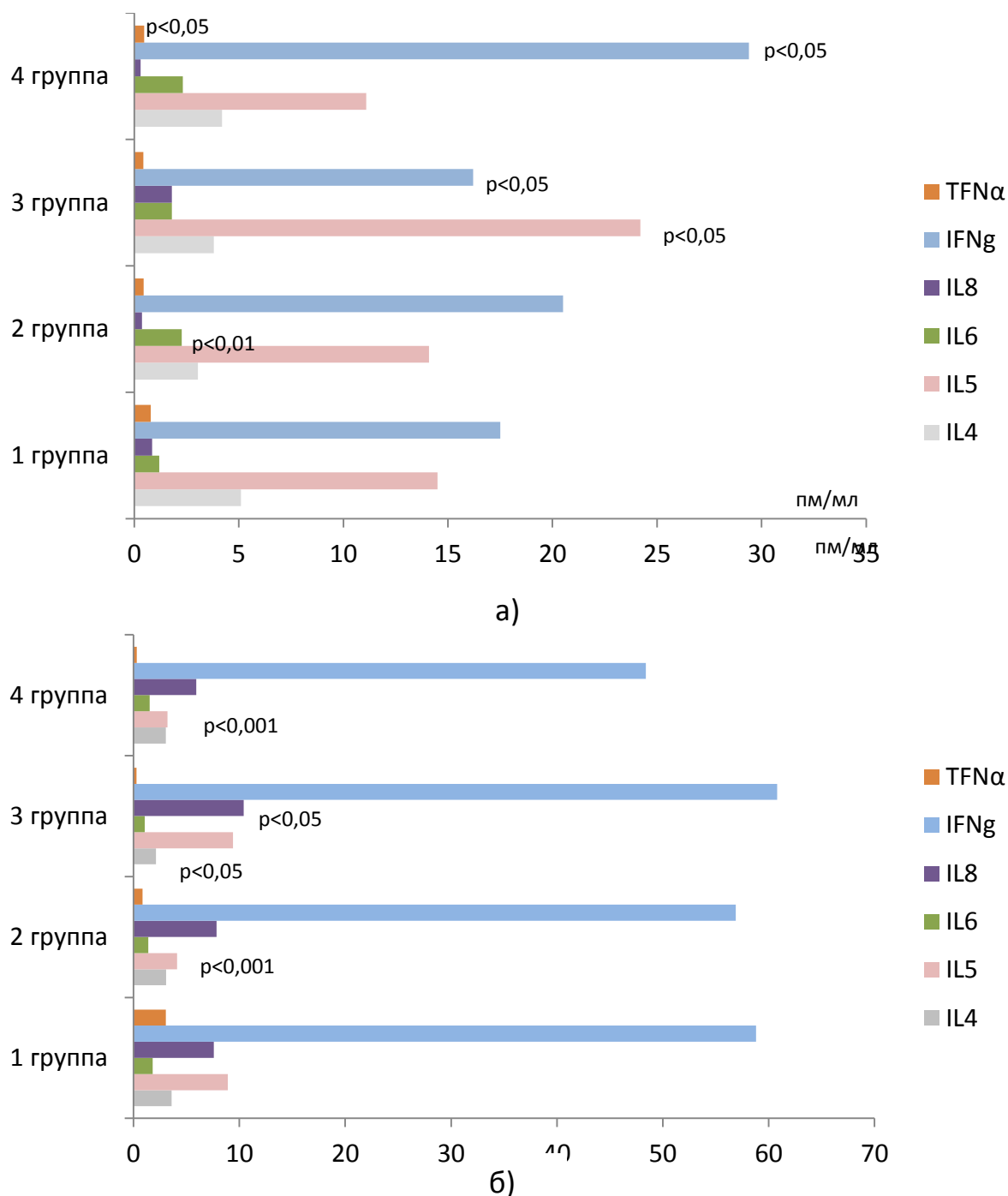


Рис. 46. Уровень некоторых цитокинов в конденсате выдыхаемого воздуха (а) и в сыворотке крови (б).

Кроме того, у пациентов, реагирующих на оба триггера, в обеих биологических средах (сыворотке крови и КВВ) обнаружен максимально высокий уровень продукции противовоспалительного ИЛ-4, регулирующего иммунный ответ, а также повышенный уровень провоспалительного ИЛ-6 в сыворотке крови, который наряду с TNF α и ИЛ-1 β традиционно рассматривается как биомаркер продолжающегося воспаления, а также как мощный фактор стимуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и усиления продукции кортизола.

С повышением уровня кортизола при воздействии стрессовых факторов происходит мгновенная индукция экспрессии CD40L глюкокортикоидами и запускается механизм синтеза IgE. Во всех обследованных группах наблюдалось увеличение уровня общего IgE с максимальными значениями показателя у больных 1 группы. Принципиально важно, что IgE может быть стимулом для проявления цитотоксичности практически всех клеток с киллерной активностью (макрофаги, тучные клетки, нейтрофилы, базофилы и др.), так как все перечисленные клетки экспрессируют рецепторы для IgE.

На общей совокупности больных прослеживалась чёткая связь между выраженностью реакции дыхательных путей (Δ ОФВ₁, %) на ИДВ и ИГХВ и базовым уровнем содержания эозинофилов в крови ($r=-0,16$; $p<0,05$ и $-0,27$; $p<0,001$, соответственно), а также между изменением ОФВ₁ в ответ на холодовую бронхопровокацию и содержанием ИЛ-5 в плазме крови ($r=-0,34$; $p<0,05$). Эти связи терялись при оценке каждой группы в отдельности.

Обнаружены существенные межгрупповые различия во взаимоотношениях респираторной функции с основными биохимическими показателями. Оказалось, что у лиц с реакцией только на дистиллированную воду (2 группа) проходимость и реактивность бронхов существенно зависели от количества продуцируемого ИЛ-4: ОФВ₁ коррелировал с содержанием ИЛ-4 в КВВ ($r=-0,48$; $p<0,01$), а степень падения ОФВ₁ в ответ на ИДВ зависела как от концентрации ИЛ-4 ($r=-0,42$; $p<0,05$) в сыворотке крови, так и от соотношения ИЛ-4 к IFN γ ($r=-0,50$;

$p < 0,05$), что подтверждало функциональную активность Th2-лимфоцитов. Весьма характерно, что у пациентов 4 группы с более легкими клиничко-функциональными проявлениями болезни была найдена чёткая связь между исходным уровнем $ОФВ_1$, секрецией IL-4 в КВВ ($r = -0,66$; $p < 0,01$) и количеством эозинофилов крови ($r = -0,23$; $p < 0,05$), что явно свидетельствовало в пользу аллергического типа воспаления.

У больных с изолированной холодовой гиперреактивностью дыхательных путей отмечалась совершенно противоположная тенденция, обусловленная, скорее всего, высокой активностью смешанного воспалительного процесса в бронхах. Исходный уровень продукции H_2O_2 и баланс соотношения вторичных продуктов перекисного окисления липидов к общему содержанию липидов в конденсате выдыхаемого воздуха значимо влияли на степень развиваемой бронхоконстрикторной реакции после холодовой бронхопровокации ($r = -0,49$; $p < 0,01$ и $r = 0,28$, $p < 0,05$, соответственно). Кроме того, изменения в проходимости бронхов ($ОФВ_1$) напрямую зависели от уровня образования IL-6 ($r = -0,67$; $p < 0,001$) и IL-5 ($r = 0,84$; $p < 0,05$), а степень падения $ОФВ_1$ после ИГХВ - от базового уровня $IFN\gamma$ в сыворотке крови ($r = -0,65$; $p < 0,001$). У пациентов 1 группы с сочетанной реакцией на оба триггера, несмотря на то, что были найдены достоверно более высокие значения H_2O_2 и IL-4, отсутствовали коррелятивные взаимоотношения с показателями бронхиальной проходимости и реактивности. В то же время, обращает на себя внимание факт влияния одного из самых важных маркеров воспаления – $TNF\alpha$ – в КВВ на выраженность бронхоконстрикторной реакции дыхательных путей после холодовой экспозиции ($r = -0,76$; $p < 0,05$), а также появление связи между гиперреактивностью бронхов и содержанием в сыворотке крови цАМФ ($r = 0,70$; $p < 0,01$), что свидетельствовало о более тяжёлом течении болезни.

Как известно, бронхиальная астма – мультифакторное и гетерогенное заболевание, непосредственно связанное с воспалением. Снижение его активности, наряду с уменьшением выраженности клини-

ческих и функциональных проявлений, достижение полного контроля становятся основными критериями оценки эффективности назначенной терапии. Принято считать, что воспаление при бронхиальной астме, сопряженное с развитием CD4+Th2-клеточной иммунной реакции в респираторном тракте, характеризуется усилением продукции IL-4, -5, -13 и минимальными изменениями в продукции цитокинов Th1. В настоящей работе представлены возможные варианты формирования воспалительной реакции, которые вносят дополнительный вклад в общее воспаление, модифицируя клиническое течение астмы.

Степень исходных нарушений функции внешнего дыхания и гиперреактивность дыхательных путей неоднозначно связаны с разными типами воспаления. Наиболее универсальным молекулярным свидетелем избыточной реакции бронхов на холодовую стимул у большинства больных был IL-5, который по существу является неспецифическим маркером аллергического воспаления. Ему отводится особая роль, как главному цитокину, выполняющему много функций, в том числе модулятора бронхоспастической реакции.

Повышенное содержание пероксида водорода в конденсате выдыхаемого воздуха было характерно для всех обследованных нами больных. В то же время имело место явное нарастание его у лиц, активно реагировавших на провокацию холодным воздухом. Найденные корреляции между степенью транзиторного сужения дыхательных путей после холодовой бронхопровокации и показателями, отражающими оксидативный стресс в КВВ, свидетельствуют о том, что интенсификация свободно-радикального окисления является одним из важных механизмов возникновения избыточной бронхоконстрикторной реакции на холод.

Наряду с высокой оксидативной реакцией клеток, у больных с изолированной реакцией на холод прослеживалась связь между уровнем образования IL-6 в КВВ и проходимость бронхов, отражая ранний этап развития воспалительного процесса. По последним данным, IL-6 является многомодальным цитокином, который оказывает влияние на дифференцировку CD4 Т-клеток, модулируя Th1/Th2 баланс в

сторону Th2 клеток. Он способствует аутокринному производству IL-4, играет роль в развитии Th2-опосредованных аллергических обострений при астме (O. Dienz, M. Rincon, 2009). С другой стороны, некоторые авторы, отметив влияние IL-6 на проходимость центральных дыхательных путей, подчёркивали независимый от аллергического воспаления в бронхах механизм его влияния (W.A. Neveu et al., 2010; A. Rubini, 2013).

Обращает на себя внимание существование тесной связи показателей, характеризующих реактивность бронхов, с уровнем продукции сывороточного IFN- γ . Ранее нами было показано изменение в циркуляции сывороточного IFN- γ после воздействия холодного воздуха у больных бронхиальной астмой, обусловленное его участием в IgE-зависимых механизмах формирования холодовой гиперреактивности дыхательных путей (А.Г. Приходько, Г.А. Макарова, 2009). Важным элементом действия IFN- γ на клетки является амплификация рецепторов к ряду цитокинов, в том числе к IL-6 и TNF- α .

У больных 3 группы имелся эозинофильно-нейтрофильный паттерн воспаления (А.Б. Пирогов и др., 2015) с превалированием нейтрофильного компонента, поскольку, наряду с высокими значениями IL-5, уровень IL-8 - мощного хемоаттрактанта нейтрофилов - был в 1,5-2 раза выше, чем в остальных группах. Как известно, реактивные формы кислорода непосредственно, либо через продукты перекисного окисления липидов посредством активации киназ могут увеличивать секрецию IL-8 и TNF- α (I. Rahman, I.M. Adcock, 2006). Сам IL-8 способен ингибировать спонтанный Fas и TNF- α -индуцированный апоптоз нейтрофилов, который является дозозависимым и проявляет супрессивные свойства при низких концентрациях (1–50 пг/мл). Вполне допустимо, что увеличение уровня IL-8 являлось адаптивной защитной реакцией организма на холодное воздействие, поскольку известно, что продолжительный контакт с холодом увеличивает количество воспалительных клеток, концентрацию лейкотриенов и изменяет цитокиновый профиль в лёгких даже у здоровых людей (K. Larsson et al., 1998).

У больных с изолированной реакцией на гипоосмотический стимул нарушение бронхиальной проходимости было сопряжено с развитием CD4+ Th2-клеточной иммунной реакции в респираторном тракте. Нами найдена тесная системная связь между продукцией IL-4 и реакцией бронхов на провокационную пробу с ингаляцией дистиллированной воды, что может не только представлять большой интерес с позиции оценки превалирующего типа воспаления, но и получить представление о механизмах, сопровождающих гипоосмолярную бронхоконстрикцию. В то же время мы не нашли у этих больных высокой активности IL-4, IL-5 и большого содержания эозинофилов крови, что могло бы свидетельствовать в пользу аллергического типа воспаления (А.Б. Пирогов и др., 2016). В некоторых работах показано, что IL-4 может проявлять неожиданные для себя специфические эффекты, участвуя в регуляции сокращения гладкомышечных клеток дыхательных путей путем изменения активности кальций-активируемых калиевых каналов через рианодиновые рецепторы. Изменения в ионной передаче сигналов – одно из самых ранних событий, стимулируемых IL-4. Как показали экспериментальные данные, этот эффект кратковременный и находится в противодействии с IL-13, т.е. проявляется при низком его уровне (G. Martin et al., 2008). В последних работах обнаружено, что гистамин посредством IL-4 увеличивает продукцию H₂O₂ бронхиальными эпителиальными клетками через экспрессию двойной оксидазы и H1-гистаминовые рецепторы (B. Rada et al., 2014).

Если у пациентов с изолированной реакцией на стимулы прослеживалась чёткая связь бронхиальной проходимости и реактивности дыхательных путей с нарушением свободнорадикального окисления в клетках и уровнем образования цитокинов, то у лиц, реагирующих на оба триггера, настораживало отсутствие предполагаемых зависимостей.

Неясно, вследствие каких причин терялась связь между основными параметрами вентиляции (ОФВ₁) и высокой воспалительной реакцией клеток, оцениваемой по базовому уровню пероксида водо-

рода в конденсате выдыхаемого воздуха и продукцией цитокинов, поскольку мы наблюдали как усиление образования H_2O_2 , так и увеличение местной и общей секреции IL-4 и TNF- α . Известно, что IL-4 не только способствует дифференцировке Th2-лимфоцитов и ингибирует развитие Th1-лимфоцитов, но и может увеличивать цитолитическую активность CD8+ цитотоксических T-лимфоцитов. Он оказывает влияние на моноциты и макрофаги, усиливая выброс TNF- α , IL-1, IL-8, IFN- γ , рост тучной клетки и тем самым, вместе с другими цитокинами, сопровождая неаллергическое воспаление. Скорее его роль была опосредованной, через воздействие на нитроксидергические реакции. Существуют данные, что IL-4 совместно с IL-10 повышает активность аргиназы и тем самым, снижает продукцию L-аргинина, участвующего в синтезе NO (В.И. Покровский, Н.А. Виноградов, 2005).

Свободные радикалы могут образовываться в ответ на действие провоспалительных цитокинов, в том числе TNF- α , для которого образование активных форм кислорода является одним из ключевых моментов в проявлении цитотоксического действия и может играть значительную роль в развитии апоптоза клеток. Важнейшей биологической функцией TNF- α является селективная для нейтрофилов высочайшая хемоаттрактантная активность. Кроме того, известно, что он, наряду с другими цитокинами (IL-6), способен стимулировать гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, в свою очередь глюкокортикоиды регулируют их секрецию по принципу отрицательной обратной связи (G.P. Chrousos, 1995; K.N. Priftis et al., 2009).

Считается, что длительное поддержание высокого уровня цитокинов, прежде всего, провоспалительных, является отражением активности и тяжести патологического процесса не только в дыхательных путях, но и в целом всего организма. Пациенты, реагирующие на оба стимула, имели более чем в половине случаев неконтролируемое течение бронхиальной астмы, нарушение респираторной функции, которое характеризовалось появлением необратимого компонента обструкции наряду с высокой лабильностью бронхов.

Следует учитывать и тот факт, что данные больные получали терапию глюкокортикоидами, что не могло не сказаться на биохимической картине воспаления. Вполне допустимо, что вследствие суммирования стимулов на первый план у этих больных выходят другие механизмы, участвующие в формировании бронхоспастической реакции, и роль воспаления становилась второстепенной, уступая место изменению в геометрии дыхательных путей, нейро-гуморальному дисбалансу, нарушению в рецепции бронхов, а именно β_2 -адренорецепторов, экспрессированных на гладкой мускулатуре дыхательных путей, и опосредующих её расслабление под влиянием эндо- и экзогенных агонистов и т.д.

В условиях хронического стресса на фоне длительно протекающей бронхиальной астмы происходит постепенное истощение функциональных резервов надпочечников, уменьшение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов с развитием относительной недостаточности, когда концентрация эндогенных глюкокортикостероидов остаётся в пределах нормы (либо немного повышается), но текущий уровень гормональной активности не способен компенсировать возникший вегетативный дисбаланс и, прежде всего, снижение функциональной активности β -адренорецепторного комплекса (G.E. Miller, E. Chen, 2006; K.N. Priftis et al., 2009). У больных 1 группы прослеживалась десенситизация β_2 -адренорецепторов, проявлявшаяся снижением концентрации стимулированного цАМФ в лимфоцитах периферической крови. В результате, текущего уровня гормональной активности надпочечников оказывается недостаточно, чтобы снизить активность воспалительного процесса и предотвратить нарушения β_2 -адренорецепторного комплекса. Ранее Е.В. Ушаковой и др. (2011) были представлены сообщения о снижении функциональной активности β_2 -адренорецепторов у больных бронхиальной астмой, которое коррелирует со степенью тяжести и уровнем контроля бронхиальной астмы.

Наряду с существующими механизмами вторичной десенситизации рецепторов, происходящей, отчасти, под влиянием медиаторов

воспаления, следует учитывать и вклад генетических детерминант, обуславливающих формирование дисфункции β_2 -адренорецепторного звена у больных бронхиальной астмой. Так, Д.Е. Наумов и др. (2012) нашли статистически значимое снижение реакции β_2 -адренорецепторов на адреналин у астматиков, гомозиготных по Arg16Arg. Выявленные клинико-функциональные особенности свидетельствовали об изменении чувствительности рецепторов, связанном со снижением уровня 3',5'-циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) по сравнению с носителями генотипа Gly16Gly.

Следовательно, существуют различные молекулярные подтипы воспалительной реакции у больных бронхиальной астмой с холодовой и осмотической гиперреактивностью дыхательных путей. Они имеют потенциальную клиническую значимость, открывают новые возможности в понимании механизмов, ответственных за формирование бронхообструктивного синдрома и перспективы его коррекции.

5.6. Участие нейтрофильной миелопероксидазы в перекисном окислении липидов и формировании реакции дыхательных путей больных бронхиальной астмой на гипоосмолярный стимул

В генезисе патологического ответа бронхов на гипоосмолярный стимул важная роль отводится эскалации оксидативного стресса, увеличивающего проницаемость биологических мембран, стимулирующего нарушение осмолярности клеток и межклеточного пространства и активацию осмочувствительных нейронов. Как было показано выше, увеличение содержания перекиси водорода и гидроперекисей липидов у больных бронхиальной астмой с осмотической гиперреактивностью бронхов указывают на повышение уровня процессов свободнорадикального окисления и ассоциируются с утяжелением реакции дыхательных путей на осмотический стимул (Ю.М. Перельман и др., 2014).

Известно, что процессы перекисного окисления липидов инициируются не только нестабильными продуктами восстановленного

кислорода, но и галогенсодержащими реагентами – продуктами реакций окисления галогенидов, катализируемых ферментом миелопероксидазой (МПО) при взаимодействии с H_2O_2 (S.J. Klebanoff, 2005). Высоко реакционноспособные оксиданты – гипогалоидные кислоты, образующиеся в системе H_2O_2 - МПО, и их производные – вторичные активные формы галогенов – модифицируют функциональные группы липидов, белков, углеводов, ДНК и других жизненно важных молекул (E. Malle et al., 2006; D.I. Pattison, M.J. Davies, 2006) и, наряду с активными формами кислорода и азота, определяют эффективность клеточного ответа при индукции и поддержании воспаления (R. Zhang et al., 2002; S.J. Klebanoff, 2005; R.P. Wilkie-Grantham et al., 2015), обеспечивая взаимосвязь между оксидативным и галогенирующим стрессом (О.М. Панасенко и др., 2013).

Основным источником активных форм кислорода и галогенов являются праймированные нейтрофильные лейкоциты (И.В. Горудко и др., 2012), депонирующие МПО в азурофильных гранулах и секретирующие фермент в межклеточную среду путем дегрануляции, стимулированной медиаторами воспаления (S.J. Klebanoff, 2005). У больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей к холодовому триггеру интенсивность дегрануляции и деструкции лейкоцитов и уровень активности МПО рассматриваются в качестве биомаркеров персистенции хронического воспаления в бронхах (А.Б. Пирогов и др., 2014).

Участвует ли миелопероксидаза нейтрофильных лейкоцитов в инициации процессов ПОЛ в формировании чрезмерной ответной реакции дыхательных путей на воздействие гипоосмолярного стимула у больных бронхиальной астмой, до настоящего времени дискуссионно. С этой целью мы исследовали индуцированную мокроту, конденсат выдыхаемого воздуха и сыворотку крови у больных бронхиальной астмой с различной реакцией бронхов на гипоосмолярный стимул до и после бронхопровокации.

У больных с положительной реакцией на стимул наблюдалось увеличение содержания эозинофильных и нейтрофильных лейкоци-

тов в индуцированной мокроте, что свидетельствовало о мобилизации клеток воспаления, связанной с рекрутированием лейкоцитов из кровеносного русла в дыхательные пути (А.Б. Пирогов и др., 2015) с превалированием нейтрофильного компонента, сочетавшегося с повышением уровня десквамации бронхиального эпителия (рис. 47).

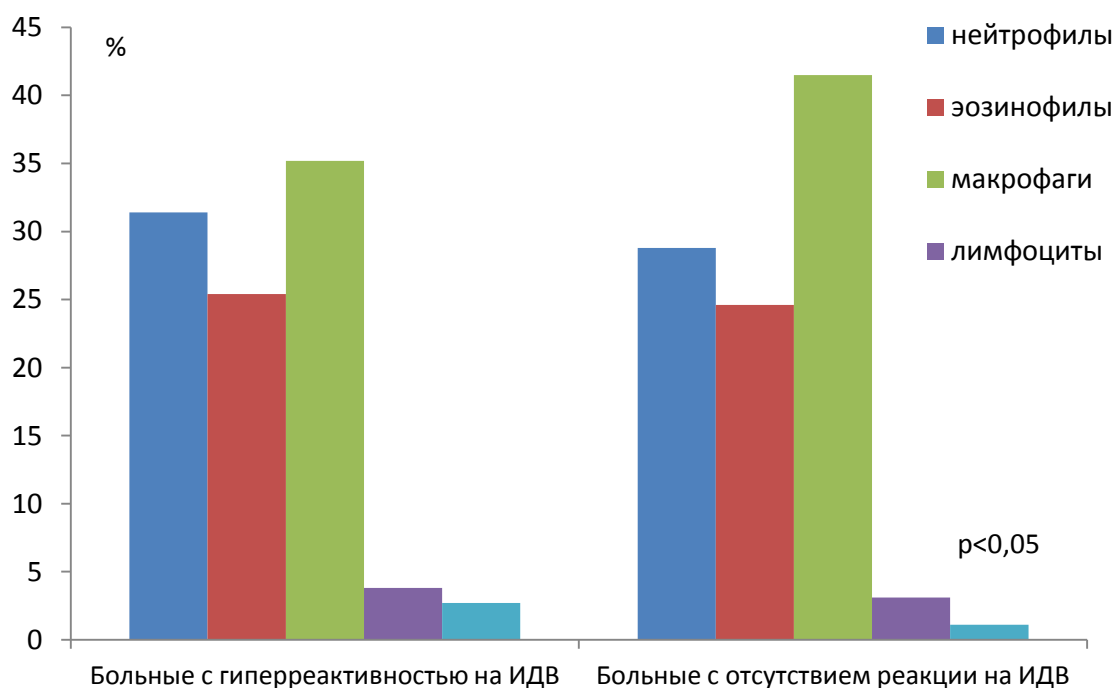


Рис. 47. Клеточный состав (в %) индуцированной мокроты (р - достоверность различий показателя между группами больных с положительной и отрицательной реакцией на ИДВ).

Функциональная активность нейтрофильных лейкоцитов, оцениваемая по степени и интенсивности деструктивно-цитолитических изменений клеток, у этих больных превышала активность нейтрофилов индуцированной мокроты в группе больных, не имевших реакции на ИДВ (ИДК – $0,43 \pm 0,04$; $0,31 \pm 0,06$, $p < 0,01$; ИДК/ИЦ – $0,94 \pm 0,04$; $0,77 \pm 0,06$, $p < 0,05$). Кроме того, у этих больных мы наблюдали тенденцию к увеличению концентрации миелопероксидазы в нейтрофилах ИМ. Средний цитохимический коэффициент МПО достигал $113,7 \pm 10,2$ пикселей ($98,2 \pm 14,64$ пикселей у больных, не показавших реакции на ИДВ) и имел обратную связь с содержанием нейтрофиль-

ных лейкоцитов ($r=-0,49$, $p<0,05$) и ИДК нейтрофилов ИМ ($r=-0,60$, $p<0,01$), что указывало на непрерывное внутриклеточное восстановление МПО в период стимулированной дегрануляции и деструкции нейтрофилов с исходом в цитолиз.

Наряду с найденными изменениями в индуцированной мокроте у больных, активно реагировавших на гипоосмолярный стимул, в КВВ был найден более высокий уровень неокисленных липидов и их окисленных производных. Базовая величина E206, отражающая содержание неокисленных липидов, у них была существенно выше, чем у больных с отсутствием реакции на ингаляцию дистиллированной воды и здоровых лиц (табл. 26).

Таблица 26. Показатели перекисного окисления липидов в КВВ до и после пробы ИДВ ($M\pm m$).

Показатель	Больные с гиперреактивностью на ИДВ	Больные с отсутствием реакции на ИДВ	Здоровые
E206, нм	$0,29\pm 0,030^{***}$	$0,19\pm 0,02^{**}$ $p<0,05$	$0,11\pm 0,030$
E233, нм	$0,04\pm 0,009^*$	$0,03\pm 0,004^*$ $p<0,05$	$0,017\pm 0,001$
E278, нм	$0,01\pm 0,003$	$0,01\pm 0,004$	-
E233/E206	$0,14\pm 0,010^{**}$	$0,15\pm 0,010^*$	$0,18\pm 0,010$
E278/E206	$0,03\pm 0,004$	$0,03\pm 0,010$	-

Примечание: Звёздочкой обозначена достоверность различий показателя в сравнении с группой здоровых * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$ ***; - $p<0,001$; p – достоверность различий показателя между группами больных с положительной и отрицательной реакцией на ИДВ.

Аналогичная тенденция была выявлена и для величины E233, отражающей содержание диеновых конъюгатов в конденсате выдыхаемого воздуха. Вследствие этого индекс окисленности (E233/E206) оказался достоверно более низким по отношению к больным, не имевшим реакции на стимул, и здоровым. В ответ на бронхопровокационную пробу происходило увеличение этого показателя, в большей степени за счёт прироста концентрации первичных продуктов пере-

кисного окисления липидов, тогда как у больных без гиперреактивности и здоровых регистрировалось снижение E233/E206 (рис. 48).

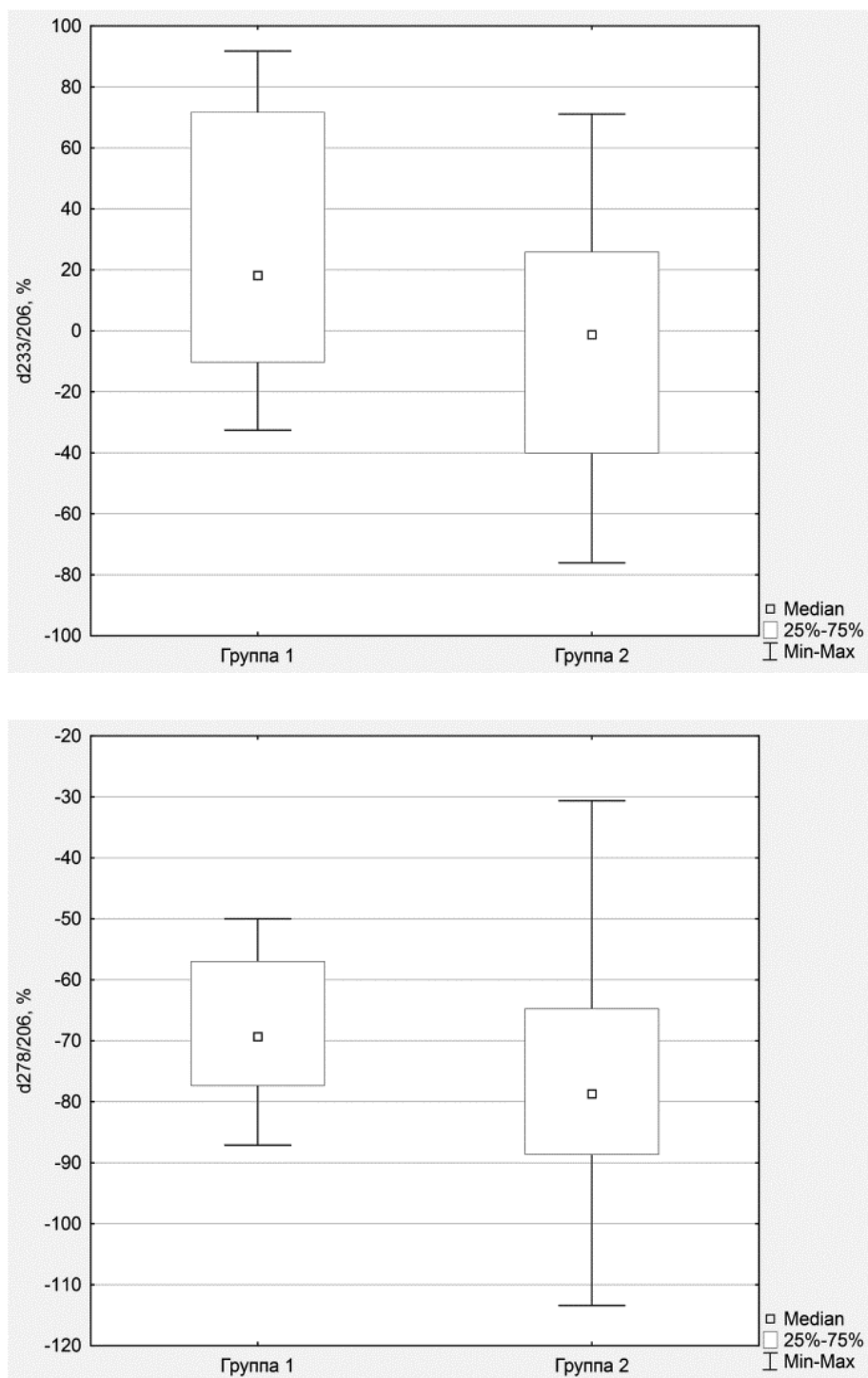


Рис. 48. Изменение индексов окисленности 233/206 и 278/206 у больных бронхиальной астмой в ответ на ИДВ (Δ ,%).

Следует подчеркнуть, что у больных, реагировавших на стимул, была найдена тесная связь между ИДК/ИЦ нейтрофильных лейкоцитов в индуцированной мокроте и соотношением E233/E206 как до, так и после бронхопровокационной пробы ($r=0,55$, $p<0,05$ и $r=0,72$, $p<0,001$, соответственно). Из этого следует, что увеличение количества, степени интенсивности цитолиза и деструкции нейтрофильных лейкоцитов, а также накопление в гранулах нейтрофилов МПО, по всей вероятности, оказывают потенцирующее влияние на окислительное повреждение липидов десмо-эпителиального барьера бронхов у больных с положительной реакцией дыхательных путей на гипосмолярный стимул.

Ранее был описан свободнорадикальный механизм взаимодействия первичных активных форм галогенов, образующихся при МПО-зависимом катализе, с ненасыщенными связями ацильных цепей фосфолипидов, завершающийся появлением типичных продуктов, обычно выявляемых при использовании традиционных способов инициирования липопероксидации, в частности, первичных молекулярных продуктов – диеновых конъюгатов и гидропероксидов (Y. Kawai et al., 2006). Роль иницирующего звена перекисного окисления липидов индуцированного активными формами галогенов в современной литературе отводится реакции хлорноватистой кислоты (HOCl) с гидропероксидной группой, всегда содержащейся в том или ином количестве в ненасыщенном липиде в результате его естественного окисления с образованием пероксильных радикалов, затем трансформирующихся в алкоксильные радикалы (Y. Kawai et al., 2006). О.М. Панасенко и др. (2013) показали, что миелопероксидаза в присутствии своих субстратов (H_2O_2 и Cl^-), так же как и активированные нейтрофилы, разрушают активированный гидропероксид с образованием О-центрированных радикалов, идентифицированных как пероксильный и алкоксильный.

В случае гидропероксида жирной кислоты, помимо О-центрированных радикалов, допущена возможность образования некоторого количества синглетного кислорода. Ингибиторный анализ,

проведённый с использованием ловушек НОС1, перехватчиков свободных радикалов и ингибиторов миелопероксидазы, подтвердил, что разрушение гидропероксидной группы в присутствии изолированной МПО или активированных нейтрофилов обусловлено непосредственной работой фермента. Это позволило сделать вывод о реально имеющем место зависимом от миелопероксидазы НОС1-индуцированном перекисном окислении липидов.

Оценивая динамику оксидант/аниоксидантной систем в сыворотке крови, мы наблюдали достоверное увеличение гидроперекисей липидов в обеих группах больных после ингаляции дистиллированной воды по отношению к базовым значениям показателя (рис. 49).

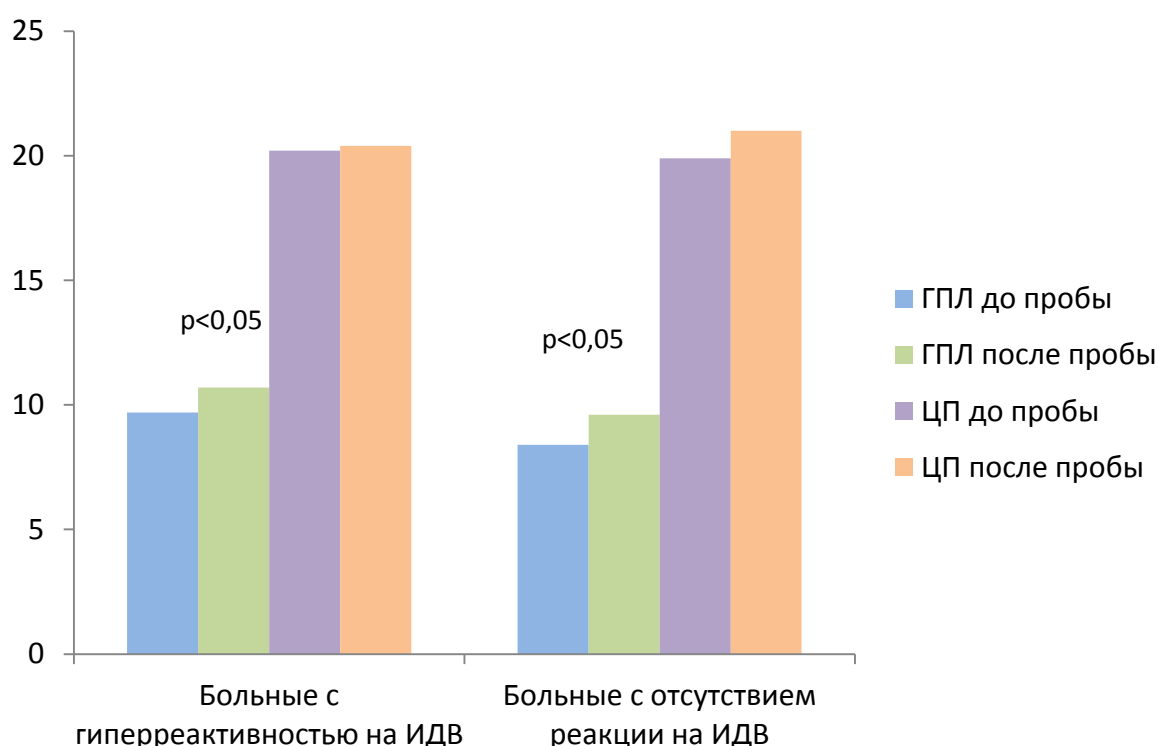


Рис. 49. Гидроперекиси липидов (ГПЛ, нмоль/мл) и церулоплазмин (ЦП, мкг/100 мл) в сыворотке крови до и после пробы с дистиллированной водой.

Церулоплазмин относится к наиболее активным перехватчикам высоко реакционноспособных гипогалоидных оксидантов, которые образуются при катализируемом миелопероксидазой окислении гало-

генидов. Он также ингибирует хлорирующую и пероксидазную активность непосредственно миелопероксидазы. Исходная концентрация церулоплазмينا в сыворотке крови у больных обеих групп больных была достоверно ниже, чем у здоровых ($33,8 \pm 3,85$ мкг/мл; $p < 0,05$; $p < 0,01$). В ответ на бронхопровокацию не происходило значимого прироста показателя как у больных с бронхоспастической реакцией на стимул, так и у лиц, не имевших реакции ($0,18 \pm 1,21$ и $2,8 \pm 1,51$ мкг/мл, соответственно).

В то же время в группе с избыточной реакцией на ингаляцию дистиллированной воды в сыворотке крови после пробы регистрировалось существенное увеличение содержания миелопероксидазы до $190,7 \pm 32,3$ нг/мл, прирост составил 20%, тогда как у пациентов без гиперреактивности наблюдалось значимое снижение показателя до $69,7 \pm 11,2$ нг/мл ($p < 0,05$). Падение составило 50%, что свидетельствовало об успешной нейтрализации нейтрофильной миелопероксидазы в крови и адекватной способности церулоплазмينا её регулировать.

Неэффективная регуляция активности внеклеточной миелопероксидазы церулоплазмином у пациентов с гипоосмотической гиперреактивностью дыхательных путей ассоциировалась с поддержанием повышенной концентрации миелопероксидазы в экстрацеллюлярном пространстве за счёт стимулированного выброса фермента из нейтрофилов при высокой индукции дыхательного взрыва и выраженном сдвиге окислительно-восстановительного статуса крови в сторону прооксидантов.

Таким образом, можно утверждать, что эскалация перекисного окисления липидов у больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на ингаляцию дистиллированной водой в значительной мере обусловлена повышением функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов, входящих в клеточный состав воспалительного инфильтрата бронхов. Увеличение количества нейтрофилов в индуцированной мокроте, и, следовательно, в бронхиальном инфильтрате, сопряжено у таких больных с интенсификацией дегрануляционно-деструктивных и цитолитических процессов, приводя-

щих к усиленному экзоцитозу и выбросу миелопероксидазы во внеклеточное пространство при одновременном ферментативном пополнении гранул и поддержании повышенной концентрации миелопероксидазы внутри клеток.

Поскольку миелопероксидаза является важным инициатором перекисного окисления липидов в реакциях оксидативного и галогенирующего стресса, нарастание содержания данного фермента в дыхательных путях служит не только индикатором уровня свободнорадикального окисления липидов, но и предиктором формирования чрезмерной реакции бронхов на гипоосмолярный стимул у больных бронхиальной астмой. Уровень церулоплазмينا у этих больных является недостаточным для регуляции и сдерживания иницируемого нейтрофильной миелопероксидазы оксидативного (галогенирующего) стресса. Дефицит антиоксидантной регуляции церулоплазмينا, обнаруженный во внеклеточной среде, связан с чрезмерной секрецией миелопероксидазы нейтрофилами.

5.7. Миелопероксидаза лейкоцитов бронхов, перекисное окисление липидов и цитокины как маркеры оксидативного стресса и воспаления у больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул

Повышение осмолярности перицилиарной жидкости у больных бронхиальной астмой, уже изначально имеющей особенности в электролитном и осмолярном составе, способствует притоку в эпителиальные и интерстициальные клетки ионов Na^+ и Cl^- (J.P. Parsons, J.G. Mastronarde, 2005). Пассивно следующий за Cl^- внутрь тучных клеток Ca^{2+} вызывает их дегрануляцию и высвобождение медиаторов, итогом чего является бронхоконстрикция (S. Rorke et al., 2002). При гиперреактивности бронхов к гиперосмолярному стимулу отмечается увеличение вязкости бронхиального секрета вследствие образования дисульфидных водородных связей между молекулами муцина, их по-

лимеризации с возрастанием гидрофобности секрета и изменением соотношения фракций золя и геля в сторону последнего (Л.Ю. Никитина и др., 2012).

Согласно концепции о ведущей роли оксидативного стресса в патогенезе ХОБЛ и бронхиальной астмы (В.А. Невзорова и др., 2006; С.К. Соодаева, И.А. Климанов, 2009), индуктором развития и поддержания бронхоспазма является гиперпродукция активных форм кислорода (АФК), пероксинитрита, гипохлорита (S.D. Anderson, P. Kirpelen, 2008, С.К. Соодаева, 2012). Происходящие в каскаде реакций свободнорадикального окисления необратимые изменения биологически важных молекул – белков, липидов, гликопротеинов, нуклеиновых кислот, разрушение биомембран, как правило, синхронизированы с повышенным потреблением и истощением резерва антиокислительной защиты (S.K. Powers et al., 2011; H. Sugiura, M. Ichinose, 2011). Провоспалительные эффекты оксидантов и их регулирующее влияние на внеклеточный метаболизм связаны со способностью модифицировать активность ядерного транскрипционного фактора NF- κ B с последующей стимуляцией экспрессии генов провоспалительных цитокинов. Окислительной модификацией белков обусловлено появление у них антигенных свойств, а окисление липидов приводит к появлению хематтрактантов, увеличивающих миграцию фагоцитов к месту их образования (Y.S. Jin et al., 2000; Y. Kawai et al., 2006).

Если генезис бронхиальной гиперреактивности у больных бронхиальной астмой связывают со стрессорным повреждением белков и гликопротеинов, инактивацией тканевых рецепторов, то развитию экссудации и дальнейших этапов воспаления бронхов способствует запуск перекисного окисления липидов (С.К. Соодаева, И.А. Климанов, 2009). Ранее нами показано, что метаболитам ПОЛ отводится важная роль в утяжелении реакции дыхательных путей на холодовой и влажностный стимул и утрате контроля над астмой (Н.М. Горячкина и др., 2011; Ю.М. Перельман и др., 2014). Как было сказано выше, процессы ПОЛ инициируются не только АФК, но и галогенсодержа-

щими реагентами – продуктами реакций окисления галогенидов, катализируемых ферментом миелопероксидазой при взаимодействии с H_2O_2 . Высоко реакционноспособные гипогалоидные кислоты, образующиеся в системе H_2O_2 - МПО, и их производные – вторичные активные формы галогенов, наряду с активными формами кислорода и азота, определяют эффективность клеточного ответа при индукции и поддержании воспаления, обеспечивая взаимосвязь между оксидативным и галогенирующим стрессом (Н. Sugiura, М. Ichinose, 2011). В проведённых ранее исследованиях уровень активности МПО в мокроте больных бронхиальной астмой, сопряжённый с интенсивностью дегрануляции и деструкции лейкоцитов, рассмотрен в качестве биомаркера гиперреактивности бронхов к гипоосмолярному стимулу и персистенции хронического воспаления в условиях гиперреактивности дыхательных путей к холодovому триггеру (J.M. Perelman et al., 2014; А.Б. Пирогов и др., 2014).

В аспекте неразрывной связи оксидативного стресса и воспаления как базисных явлений и важнейших патогенетических компонентов бронхиальной астмы представляют интерес сведения о роли активности МПО и процессов липопероксидации в формировании чрезмерной ответной реакции дыхательных путей на гиперосмолярный стимул.

Оценивая воспалительно-клеточный паттерн ИМ (рис. 50) у лиц с положительной и отрицательной реакцией бронхов на ингаляцию гипертонического раствора, мы наблюдали увеличение количества гранулоцитарных эффекторов воспаления – эозинофилов и нейтрофилов, на фоне повышенного числа лимфоцитов и двукратного снижения числа макрофагов.

В структуре гранулоцитарной популяции в обеих группах доминировали нейтрофилы, однако их число с достаточно высокой степенью цитолитической активности превалировало у пациентов с гиперреактивностью дыхательных путей на ИГР, аналогичные тенденции прослеживались для эозинофилов. Подобный паттерн, с превалированием нейтрофильного компонента, наблюдался нами ранее у больных

бронхиальной астмой с холодовым бронхоспазмом (Т.А. Maltseva et al., 2013). Этот паттерн несколько отличается от наблюдаемого у больных с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул (J.M. Perelman et al., 2015).

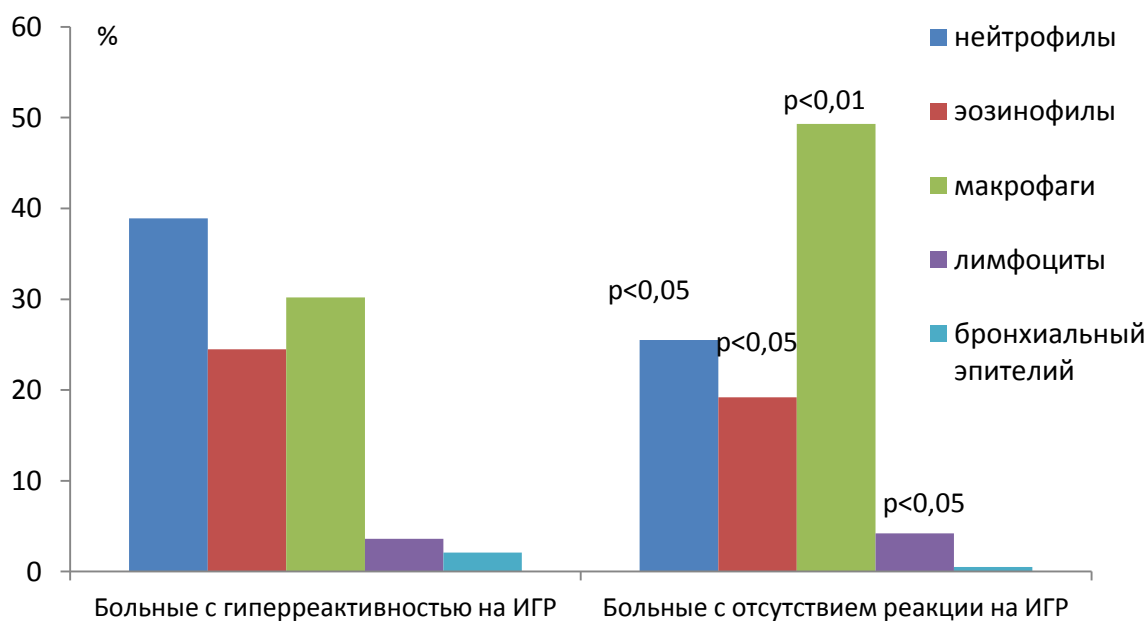


Рис. 50. Клеточный состав индуцированной мокроты (р - достоверность различий показателя между группами больных с положительной и отрицательной реакцией на ИГР).

По данным литературы, цитолиз является одним из вариантов высвобождения провоспалительных ферментов из лейкоцитов, существуя в этом качестве наряду с клеточной дегрануляцией (S.J. Klebanoff, 2005). Дегрануляция представляет собой физиологический процесс, обеспечивающий транспорт ферментов и медиаторов из клеток в окружающую среду с целью регуляции гомеостаза тканевого микрорайона. Одним из морфологических и цитологических эквивалентов дегрануляции служит в разной степени выраженная деструкция клеток, не имеющая обязательным следствием клеточную гибель. Цитолиз в большей мере, чем деструкция, ассоциируется с воздействием повреждающих факторов, приводящих к нарушению целостности клеточных мембран, изоляцией клетки от её окружения с по-

следующим развитием или прогрессирующим воспалением (В.А. Невзорова и др., 2006).

Наиболее вероятной причиной, приводящей усилению цитолиза нейтрофилов и некротического пути гибели лейкоцитов в бронхиальном инфильтрате у астматиков с бронхоспазмом на ИГР служила значительная воспалительная стимуляция синтеза и секреции МПО в экстрацеллюлярное пространство. У этих больных мы наблюдали существенно более высокий уровень СЦК МПО в ИМ, чем у больных не имевших реакции на стимул ($142,5 \pm 11,0$ и $97,9 \pm 26,0$ пикселей, соответственно, $p < 0,05$).

Роль перекисного окисления липидов в формировании гиперреактивности дыхательных путей на гиперосмолярный стимул

Наряду с повышенной активностью миелопероксидазы в индуцированной мокроте, в конденсате выдыхаемого воздуха у больных бронхиальной астмой наблюдалось повышенное содержание неокисленных липидов и их окисленных производных по отношению к здоровым лицам. У больных, активно реагировавших на гипертонический раствор, после бронхопровокации фиксировалось увеличение содержания окисленных липидных продуктов $\Delta E233$ с появлением значимых различий для индекса $E233/E206$ по отношению к лицам без реакции на стимул ($0,19$ ($0,16; 0,31$) и $0,14$ ($0,08; 0,19$), соответственно, $p = 0,02$) (рис. 51).

Обнаружена тесная корреляция между $\Delta FЖЕЛ$, отражающим реакцию дыхательных путей на бронхопровокацию гипертоническим раствором, и базовым содержанием диеновых конъюгатов ($r = -0,43$, $p = 0,005$), кетодиенов и сопряженных триенов ($r = -0,37$, $p = 0,01$), индексов окисленности липидов $E233/E206$ ($r = -0,4$, $p = 0,01$), $E278/E206$ ($r = -0,39$, $p = 0,01$) и гидроперекисями липидов ($r = -0,44$, $p = 0,006$). Относительный прирост индекса окисленности для первичных продуктов липопероксидации ($\Delta E233/E206$) был обратно связан с амплитудой снижения параметров вентиляционной функции легких: $\Delta FЖЕЛ$ ($r =$

0,44, $p=0,004$), $\Delta\text{ОФВ}_1$ ($r=-0,36$, $p=0,02$), $\Delta\text{МОС}_{50}$ ($r=-0,37$, $p=0,01$). Аналогичные корреляции отмечались между переменными $\Delta\text{ФЖЕЛ}$, $\Delta\text{ОФВ}_1$ и изменением содержания гидроперекисей липидов ($r=-0,46$, $p=0,004$ и $r=-0,39$, соответственно, $p=0,01$).

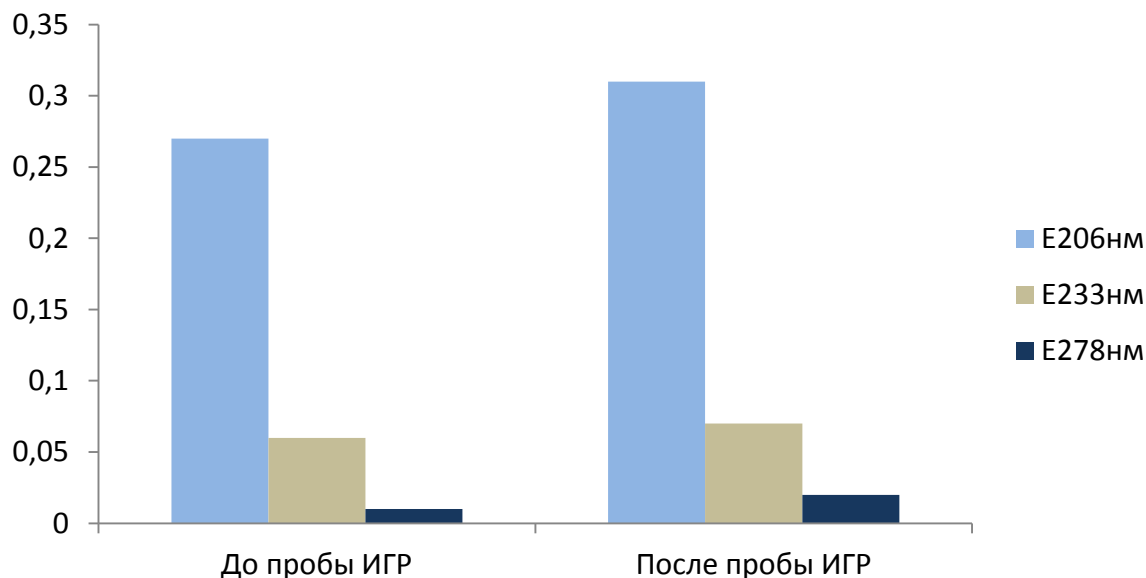


Рис. 51. Динамика показателей ПОЛ у больных с гиперреактивностью дыхательных путей на ИГР.

С накоплением МПО в лейкоцитарных гранулах, последующим высвобождением фермента при клеточной деструкции и цитолизе, поддержанием, таким образом, каталитической функции МПО и продукции АФГ в тканях связан уровень ПОЛ в сыворотке крови. При исследовании базового уровня гидроперекисей липидов крови больных с положительной и отрицательной реакцией на гиперосмолярный стимул были обнаружены более высокие значения этого показателя в сравнении с группой контроля (табл. 27).

Это указывало на мобилизацию каскада реакций свободнорадикального окисления, вовлекающего различные системы организма при бронхиальной астме. После пробы ИГР концентрация гидроперекисей липидов в обеих группах прирастала, с достоверными отличиями у больных с чрезмерной реакцией бронхов на воздействующий триггер, существенно превысив показатель гидропероксидов в группе

сравнения. У этих больных повышенная продукция гидроперекисей липидов в сыворотке крови после пробы сопровождалась высокой реактивностью мелких бронхов ($МОС_{50}$) на гипертонический раствор ($r=-0,75$; $p=0,023$).

Таблица 27. Показатели гидроперекисей липидов (ГПЛ, нмоль/мл), витамина Е (ВитЕ, мкг/мл), церулоплазмينا (ЦП, мкг/мл) крови до и после проведения пробы ИГР ($M \pm m$).

Показатели	Больные с гиперреактивностью на ИГР	Больные с отсутствием реакции на ИГР	Здоровые
ГПЛ, нмоль/мл	$\frac{16,5 \pm 0,6^{**}}{19,8 \pm 1,0}$	$\frac{14,6 \pm 0,6}{16,2 \pm 0,8}$ $p < 0,05$	$12,4 \pm 1,2$
Δ ГПЛ, нмоль/мл	$3,30 \pm 0,70$	$1,31 \pm 0,67$ $p < 0,05$	
ВитЕ, мкг/мл	$\frac{33,4 \pm 1,6^{***}}{34,8 \pm 1,8}$	$\frac{30,0 \pm 0,8^{***}}{29,9 \pm 1,2}$	$38,1 \pm 1,5$
Δ ВитЕ, мкг/мл	$1,4 \pm 1,40$	$-0,1 \pm 1,08$	
ЦП, мг/100мл	$\frac{23,2 \pm 1,0^{**}}{23,3 \pm 0,9}$	$\frac{23,1 \pm 2,3^{**}}{21,8 \pm 1,1}$	$33,8 \pm 2,9$
Δ ЦП, мг/100мл	$0,10 \pm 0,60$	$-1,30 \pm 1,60$	

Примечание: в числителе значения показателя до пробы ИГР, в знаменателе – после пробы ИГР; Δ - разность абсолютных значений показателя до и после пробы ИГР.

Исходно высоким показателям гидроперекисей липидов в группе с гиперреактивностью на ИГР соответствовали приведённые ранее данные цитологического и цитохимического анализа ИМ. Чем интенсивнее протекали процессы цитолиза нейтрофилов и активнее происходило накопление внутрилейкоцитарной МПО на фоне усиленной нейтрофилизации воспаления в бронхах, тем было выше содержание гидропероксидов в крови. Все это служило косвенным подтверждением участия АФГ, образующихся при МПО–зависимом катализе, в генерации продуктов ПОЛ.

В качестве фактора регуляции и сдерживания галогенирующего стресса, масштабы которого определяются не только количеством и активностью МПО, секретируемой во внеклеточное пространство, но и эффективностью естественных перехватчиков АФГ (О.М. Панасенко и

др., 2013), была исследована динамика содержания церулоплазмينا в сыворотке крови до и после пробы ИГР. В обеих группах больных бронхиальной астмой, по отношению к здоровым лицам, наблюдалось исходно пониженное содержание церулоплазмينا. Этот плазменный белок является самым эффективным перехватчиком НОСІ и сосуществует в этом качестве с глутатионом, таурином, аскорбатом, уратом, также имеющими очень высокие константы скорости реакции с НОСІ (О.М. Панасенко и др., 2008). Увеличение числа нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов в индуцированной мокроте, повышение уровней их деструкции и цитолиза, а также нарастание СЦК МПО лейкоцитов у больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью на ИГР свидетельствовало об активации синтеза и выброса МПО из клеток. Наблюдаемый у этих больных дефицит церулоплазмينا, скорее всего, был связан со стимуляцией воспаления и сдвигом окислительно-восстановительного статуса в сторону прооксидантов.

В условиях галогенирующего (оксидативного) стресса пониженный уровень церулоплазмينا ассоциируется с нарушением его адекватной способности к образованию в плазме крови комплексов с МПО и ингибированию как хлорирующей, так и пероксидазной активности фермента (О.М. Панасенко, В.И. Сергиенко, 2010; A.V. Sokolov et al., 2008). Об этом свидетельствовала и найдена нами тесная связь между исходным содержанием церулоплазмينا и уровнем гидроперекисей липидов в сыворотке крови после бронхопровокации гипертоническим раствором ($r=-0,76$; $p<0,05$), а также последующей реакцией мелких бронхов ($МОС_{50}$) на пробу ИГР ($r=0,73$; $p<0,05$).

Изучение динамики другого антиоксиданта крови – витамина Е – показало, что у больных бронхиальной астмой базовое содержание его в сыворотке крови было достоверно ниже по отношению к здоровым. После проведения пробы ингаляции гипертоническим раствором концентрация витамина Е в обеих группах больных значимо не менялась. Следует отметить, что низкие концентрации витамина Е имеют неблагоприятное прогностическое значение при лечении больных

астмой, поскольку витамин Е выступает в качестве средства регуляции биотрансформации и фармакологического действия лекарственных веществ путем изменения активности ферментов метаболизма ксенобиотиков, в том числе системы цитохрома P450 (В.В. Шумянцева и др., 2014).

Цитохром P450 3A4 является наиболее функционально значимым среди цитохромов P450, так как метаболизирует 637 субстратов и участвует в метаболизме 50% применяемых лекарственных препаратов. АФК могут взаимодействовать с цитохромом P450, вызывая инактивацию фермента. Витамин С, витамин А и витамин Е воздействуют на каталитическую активность цитохрома P450 3A4. Поскольку восстановление гема цитохрома P450 является основной стадией в катализе и сопровождается генерированием АФК, витамин Е оказывает влияние на каталитические функции этого гемопротейна. В электрохимических системах при восстановлении цитохромов P450 также генерируются АФК, таким образом, в литературе обсуждается влияние веществ – «ловушек» АФК, включающих витамин Е, на электрокатализ (В.В. Шумянцева и др., 2014).

На основании изложенных данных можно прийти к заключению, что у больных бронхиальной астмой имеет место эскалация ПОЛ и оксидативного стресса – по результатам содержания в плазме крови гидроперекисей липидов, обладающих способностью участвовать в дальнейших цепных реакциях образовании свободных радикалов и метаболитов ПОЛ. При этом обнаруженный недостаток нейтрализации токсичных молекул ПОЛ, манифестируемый снижением концентраций антиоксидантов – витамина Е и церулоплазмينا – потенцирует накопление АФК и АФГ, к выработке которых причастна МПО гранулярных лейкоцитов инфильтрата. Интенсификация воспаления и оксидативного стресса наиболее ярко прослеживается у больных с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул.

Отсюда следует, что индукция воспаления в виде высокой функциональной активности нейтрофильных и эозинофильных лей-

коцитов в сторону преобладания нейтрофилов, максимального депонирования миелопироксидазы в азурофильных гранулах и максимального экзоцитоза фермента при клеточной деструкции и цитолизе, в сочетании с эскалацией оксидативного (и галогенирующего) стресса служат индикаторами реакции бронхов на ингаляцию гипертоническим раствором при астме. Выраженное воспаление с участием МПО активированных (праймированных) лейкоцитов и усиление перекисного окисления липидов лежат в основе такой чрезмерной бронхиальной чувствительности и гиперреактивности. Оценка активности МПО как продукта провоспалительной ферментативной деятельности лейкоцитов и ПОЛ как процесса, в котором принимает участие МПО–зависимый катализ образования высоко реакционноспособных реагентов–оксидантов, могут быть рассмотрены в качестве маркеров гиперреактивности дыхательных путей к гиперосмолярному стимулу. Необходимо подчеркнуть, что изучение миелопироксидазы и ПОЛ как маркеров осмотической гиперреактивности бронхов имеет непосредственное отношение к персонализированной медикаментозной коррекции астмы и тем самым способствует адекватному контролю над болезнью.

*Роль провоспалительных и противовоспалительных
цитокинов в формировании реакции дыхательных путей на
гиперосмолярный стимул*

Поиск и характер взаимосвязей морфофункционального статуса клеток воспаления с Th1- и Th2-профилями бронхиальных цитокинов, их роль в эндогенной регуляции воспаления, хемотаксиса, апоптоза, пролиферации и функционировании моноцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, поддержании нарушенного гомеостаза и иммунитета у лиц с осмотической гиперреактивностью бронхов активно обсуждается.

Ранее было установлено, что гипохлорит, наряду с АФК, модифицирует активность ядерного транскрипционного фактора NF- κ B с последующей стимуляцией экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, GM-CSF, TNF и других цитокинов из Th1-типа,

которые стимулируют рост и дифференцировку ранних и поздних гранулоцитарных предшественников, формирование нейтрофильных колоний в культуре кроветворных клеток, способствуют мобилизации нейтрофилов из костного мозга, тем самым увеличивая пул циркулирующих нейтрофилов и миграцию лейкоцитов в очаг воспаления (Y.S. Jin et al., 2000; В.Н. Титов, 2003). Данное обстоятельство увеличивает интерес к цитокинам Th1-типа, как медиаторам специализированной дифференцировки нейтрофилов и эозинофилов в воспалительном инфильтрате.

Выраженное супрессирующее влияние на активность ядерного транскрипционного фактора NF- κ B и экспрессию адгезионных молекул на эндотелии, предварительно активированном провоспалительными цитокинами, оказывает IL-10 (Э.А. Старикова и др., 2003; H. Fickenscher et al., 2002). IL-10 принадлежит к приоритетным для астмы цитокинам Th2-типа, индуцирующим и потенцирующим IgE-опосредуемый выброс гистамина из базофилов, которые обуславливают специфическую аккумуляцию и активацию эозинофилов в бронхолегочном регионе (E. Hammelmann, E.W. Gelfand, 2001; P.C. Fulkerson et al., 2006).

Известно, что экзоцитоз провоспалительных ферментов из нейтрофилов, опосредованный влиянием IL-8 из CXCL (суперсемейства хемокинов), секретлируемого активированным эндотелием, занимает ключевую позицию в хематтракции лейкоцитов, способствует их выходу из посткапиллярных венул и рекрутированию в очаг воспаления (И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, 1999; Э.А. Старикова и др., 2003). IL-8 повышает в лейкоцитах концентрацию Ca^{2+} , в результате чего стимулируется движение клеток, активизируется пентозофосфатный шунт и индуцируется продукция АФК (С.Н. Серебренникова, И.Ж. Семинский, 2008).

В общей группе больных бронхиальной астмой обнаружен существенный, практически в два раза, прирост концентрации IL-8 в КВВ в ответ на бронхопровокационную пробу с ингаляцией гипертонического раствора хлорида натрия (рис. 52).

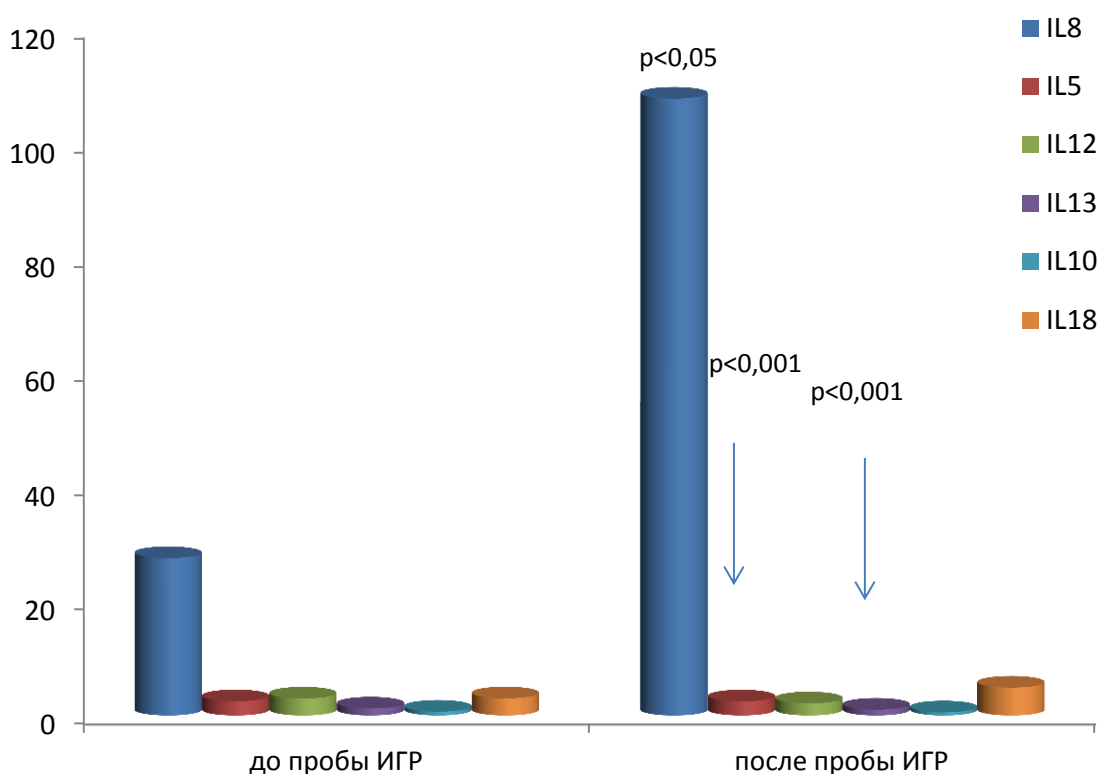


Рис. 52. Уровень цитокинов (пг/мл) в конденсате выдыхаемого воздуха у больных бронхиальной астмой до и после бронхопровокации гипертоническим раствором.

Схожая картина в поведении IL-8 прослеживалась при разделении больных на группы (табл. 28). Характерно, что у пациентов с бронхоспастической реакцией на аэрозольную ингаляцию 4,5% раствора NaCl, значения IL-8 как до, так и после пробы преобладали над таковыми в группе с отсутствием изменений в проходимости дыхательных путей на триггер.

Такая динамика IL-8 в группе больных активно реагировавших на ингаляцию гипертонического раствора, соотносится с большим числом нейтрофилов, найденных у этих пациентов в индуцированной мокроте, а также их способностью активироваться к самостоятельному синтезу и секреции IL-8. К цитокинам, продуцируемым нейтрофилами (нейтрофилокинам), принадлежат и G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, TNF. Они все вместе участвуют в кооперативном взаимодействии клеток–фагоцитов, действуя паракринно на макрофаги, аутокринно –

на нейтрофилы, и составляют цитокиновый фон, активирующий функции нейтрофилов (И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, 1999; Г.И. Васильева и др., 2000).

Таблица 28. Уровень цитокинов (пг/мл) в конденсате выдыхаемого воздуха у больных бронхиальной астмой до и после бронхопровокации гипертоническим раствором (медиана, нижний и верхний квартили).

Цитокин	1 группа	2 группа	Здоровые
IL-5	<u>2,81 (2,21; 4,74)</u>	<u>2,34 (1,82; 3,09) p<0,05</u>	<u>2,32 (1,02; 2,70)</u>
	3,38 (2,13; 4,18)*	2,22 (2,02; 2,74) p<0,01	2,08 (1,74; 2,60)
IL-8	<u>37,2 (27,6; 106,1)</u>	<u>13,7 (12,9; 42,4)</u>	–
	208,0 (114,1; 228,5)	91,35 (5,05; 199,0)	
IL-12	<u>3,03 (2,82; 3,39)***</u>	<u>2,95 (2,73; 3,16)***</u>	<u>2,13 (2,03; 2,22)</u>
	2,09 (2,03; 2,43)***	2,18 (2,05; 2,78)**	2,09 (2,01; 2,10)
IL13	<u>1,74 (1,59; 2,51)</u>	<u>1,07 (0,71; 1,83) p<0,05</u>	–
	2,04 (1,34; 2,20)	1,00 (0,61; 1,70)	
IL-10	<u>0,62 (0,34; 0,78)***</u>	<u>0,69(0,51; 1,78) p<0,05***</u>	<u>0,05 (0,03; 0,09)</u>
	0,45 (0,32; 0,77)***	0,62 (0,27; 0,80)****	0,04 (0,03; 0,09)
IL-18	<u>2,2 (1,93; 2,34)</u>	<u>3,48 (2,47; 4,76) p<0,05</u>	–
	4,76(3,88; 7,36)	5,09 (3,02; 6,63)	

Примечание: в числителе представлены значения показателя до пробы ИГР, в знаменателе – после пробы ИГР; * – достоверность их различий ** - p<0,01; *** - p<0,001); звёздочка* – достоверность различий показателя в сравнении со здоровыми (* p<0,05; *** p<0,001); p – достоверность различия показателя между группами больных.

Параллельно этому, IL-8 в числе других провоспалительных цитокинов активирует эозинофилы, которые в свою очередь могут синтезировать и секретировать IL-8, наряду с агрессивной цитотоксической пероксидазой (P. Lacy, R. Moqbel, 2000; S.P. Hogan et al., 2008).

Синергистом IL-8 в экспрессии адгезионных молекул на эндотелии с целью привлечения и активации лейкоцитов выступает IL-12 (Э.А. Старикова и др., 2003), стимулирующий выработку хемоаттрактантов, цитокинов и факторов роста не только эндотелием, но и фибробластами и лейомиоцитами (И.С. Фрейдлин, 2001). В результате этого воспаление усиливается и поддерживается, приобретая персистирующее течение.

Мы наблюдали исходно высокие значения IL-12 в обеих группах больных бронхиальной астмой по отношению к здоровым лицам, с превалированием у пациентов с гиперреактивностью бронхов на аэрозоль. Кроме того, у больных прослеживалась тесная корреляционная связь между базовым содержанием IL-12 в КВВ и показателем СЦК МПО лейкоцитов ИМ ($r=0,43$; $p<0,05$). После проведения пробы ИГР уровень IL-12 в КВВ у астматиков достоверно снижался, в большей степени у лиц активно реагирующих на осмотический стимул, причиной чего могло быть ингибирование при бронхоспазме противовоспалительными цитокинами активности IL-12 как главного фактора дифференцировки Th1 из T-индукторов.

Исследование IL-18 в КВВ, который принадлежит к семейству IL-1 (Е.В. Якушенко и др., 2005), показало, что в обеих группах наблюдалась тенденция к увеличению его концентрации после проведения пробы ИГР. Обращают на себя внимание достоверно более высокое содержание IL-18 у больных, не имевших реакции на триггер исходно и после пробы ИГР. По всей видимости, это связано с плеiotропностью эффектов IL-18 в отношении многих типов клеток и влиянием на секрецию различных по своей функциональной направленности медиаторов (Е.В. Якушенко и др., 2005), позволяющим IL-18 принимать участие как в клеточном, так и гуморальном иммунном ответе (К. Nakanishi et al., 2001; S.K. Gandhapudi et al., 2015).

Помимо основного эффекта IL-18 – индукции синтеза IFN γ T- и NK-клетками, IL-18 также стимулирует продукцию GM-CSF, TNF, IL-5, IL-6, IL-8, IL-1 и таких противовоспалительных цитокинов, как IL-4, IL-13 (Е.В. Якушенко и др., 2005; A.J. Puren et al., 1998; T.A. Fehniger et al., 1999; T. Ogura et al., 2001; K. Nakanishi et al., 2001). *In vitro* установлено, что IL-18 индуцирует созревание наивных CD4⁺ лимфоцитов в IL-4–продуцирующие клетки, увеличивает секрецию IL-13 T- и NK-клетками (T. Hoshino et al., 1999). Возможно, у больных бронхиальной астмой 2 группы IL-18 действует главным образом как стимулятор базофилов и тучных клеток к продукции IL-4 и IL-13. У пациентов 1 группы, предположительно, на первый план выступает провоспалитель-

тельный синергизм IL-18 и IL-12, обладающих схожими биологическими эффектами (Е.В. Якушенко и др., 2005). Известно, что для продукции IFN γ Т-клетками требуется синергичное действие IL-18 и IL-12 (Н. Okamura et al., 1998), в то время как НК-клеткам достаточно взаимодействия только с IL-18, хотя совместное влияние IL-18 и IL-12 оказывает более сильный эффект (Т.А. Fehniger et al., 1999).

Считается, что IL-18, обладая в комбинации с IL-12 антиаллергическим действием, в изолированном виде может стимулировать продукцию факторов аллергического воспаления (Е.В. Якушенко и др., 2005). Следует отметить, что IL-18 продуцируется главным образом макрофагами, количество которых в бронхах больных бронхиальной астмой меньше, чем в контроле. Отсюда следует участие IL-18 в гуморальном иммунном ответе, в пользу чего свидетельствуют данные о конститутивной экспрессии IL-18 бронхиальными эпителиоцитами – главной мишенью повреждения при астме. В патогенезе астмы провоспалительный IL-18 потенцирует развитие аллергического воспаления, приоритет в реализации которого принадлежит цитокинам Th2-профиля – IL-5, IL-13, IL-10.

Что касается IL-5 и IL-13 в КВВ, их базовая концентрация была достоверно выше у лиц с гиперреактивностью бронхов на ИГР, и значительно прирастала после ингаляции 4,5% гипертонического раствора. Высокие концентрации цитокинов у этих больных отражали активацию их регуляторного воздействия, заинтересованную в реализации бронхоспазма. Известно, что IL-5 секретируется Т-лимфоцитами, тучными клетками и эозинофилами и является ключевым цитокином созревания, пролиферации и дифференцировки эозинофилов, регулятором продукции интегринов (адгезионных молекул CD11b/CD18), которые увеличивают количество циркулирующих эозинофилов. Его активация ассоциируется с эозинофильным воспалением при астме (И.И. Иванчук и др., 2004; Е. Hammelmann, Е.W. Gelfand, 2001; S.P. Hogan et al., 2008).

У пациентов с гиперреактивностью высокому уровню IL-5 в КВВ соответствовало максимальное количество эозинофилов в цито-

грамме ИМ. При проведении корреляционного анализа у больных бронхиальной астмой нами была получена тесная связь между ИДК эозинофилов ИМ и концентрацией IL-5 в КВВ после пробы ИГР ($r=0,65$; $p<0,05$). Увеличение уровня IL-13 после пробы ИГР у этих больных, по всей видимости, было сопряжено с формированием бронхиальной гиперреактивности, реализуемой ключевыми свойствами IL-13 – переключением В-лимфоцитов на синтез IgE, активацией эозинофилов и привлечением их в очаг воспаления (S.N. Georas et al., 2005; L. Cameron et al., 2006).

Оценивая динамику IL-10 в конденсате выдыхаемого воздуха как до, так и после бронхопровокации, его уровни в обеих группах больных достоверно превышали уровень контроля, при этом базовый уровень IL-10 у лиц с гиперреактивностью бронхов на ИГР был значимо ниже тех, кто не имел реакции. Проба ИГР приводила к снижению концентрации IL-10 во всех группах. Вероятнее всего, повышенные концентрации IL-10 в КВВ у больных бронхиальной астмой, по отношению к здоровым лицам, обусловлены низким содержанием макрофагов в ИМ у этих пациентов. Существенно, что у лиц с гиперреактивностью дыхательных путей на ИГР прослеживалась тесная связь между уровнями содержания макрофагов в ИМ и IL-10 в КВВ ($r=-0,71$; $p<0,05$). *In vivo* IL-10, синтезируемый активированными макрофагами, вслед за TNF, IFN γ и IL-12, аутокринно ингибирует синтез и секрецию провоспалительных цитокинов. Наряду с тем, что IL-10 является универсальным противовоспалительным цитокином и блокатором активности макрофагов, он подавляет трансдукцию сигнала, опосредованного ERK1, ERK2 и другими MAP-киназами. Последнее важно для индукции синтеза и секреции ряда хемокинов и цитокинов, а также дестабилизации мРНК цитокинов Th1-типа (H. Fickenscher et al., 2002).

Изложенные данные позволяют утверждать, что динамические взаимоотношения противовоспалительных и провоспалительных цитокинов формируют морфофункциональный профиль инфильтрата дыхательных путей больных бронхиальной астмой при гиперреактив-

ности на гиперосмолярный стимул. Цитокинами регулируется функциональная активность всех гранулоцитарных эффекторов смешанного нейтрофильно-эозинофильного фенотипа воспаления. У астматиков с осмотической гиперреактивностью бронхов интенсификация регуляторного воздействия IL-8, IL-18 прослеживается наряду с активацией функции противовоспалительных цитокинов. Известно, что определённые сочетания цитокинов вызывают перепрограммирование участвующих в иммунном ответе и воспалении эндотелиальных клеток. В свою очередь, экспрессия адгезионных молекул и продукция хемокинов эндотелиальными клетками находится под контролем провоспалительных цитокинов.

Эндотелиальные клетки являются продуцентами не только хемокинов, ростовых факторов, про-воспалительных цитокинов, но и цитокинов Th2-типа (И.С. Фрейдлин, Ю.А. Шейнин, 2001). Наряду с этим, также известно, что чрезмерное образование провоспалительных цитокинов может приводить к респираторному взрыву в нейтрофилах, индуцирует фагоцитоз, дегрануляцию лейкоцитов, продукцию и секрецию лизосомальных ферментов, лейкотриенов, свободных радикалов (В.Н. Титов, 2003; С.Н. Серебренникова, И.Ж. Семинский, 2008).

Исследованные нами деструкция и интенсивность цитолиза нейтрофилов и эозинофилов, направленные на экзоцитоз МПО, а также предшествующие процессы синтеза и накопления фермента в клетках стимулируются провоспалительными цитокинами, депонируемыми нейтрофилами и эозинофилами. Эозинофилы реализуют агрессивные эффекты путём секреции метаболитов кислорода (P. Lacy et al., 2003) и цитотоксических гранулярных белков, включающих эозинофильную пероксидазу, что потенцирует выделение медиаторов и протеаз из тучных клеток и базофилов (S.P. Hogan et al., 2008). В ремоделировании дыхательных путей при бронхиальной астме среди фиброгенных факторов (TGF-beta, FGF2, MMP, VEGF, IL-1B, IL-17 и др.), источниками которых служат эозинофилы (A.B. Kay et al., 2004; P.C. Fulkerson et al., 2006; S.P. Hogan et al., 2008),

участвует противовоспалительный IL-13 – его повышенный уровень выявлен нами у больных с бронхоконстрикторной реакцией на ингаляцию гипертоническим раствором.

IL-5, IL-6, IL-13 выступают мощными внешними регуляторами апоптоза, элиминирующего эффекторы воспаления с целью его ограничения. Установлено, что у больных бронхиальной астмой IL-5–зависимое увеличение экспрессии генов bcl-2 негативно влияет на апоптоз, пролонгируя повреждающую активность эозинофилов и увеличивая долю клеток, гибнущих путём некроза, стимулируя воспаление (И.И. Иванчук и др., 2003, 2004). Сведения о супрессии апоптоза и преимущественно некротическом пути гибели эозинофилов при астме, приводящем к выбросу из эозинофилов провоспалительных цитокинов и медиаторов, и увеличении числа некротизированных полинуклеаров в индуцированной мокроте больных бронхиальной астмой (В.А. Невзорова и др., 2006) согласуются с полученными нами данными о значительной активации у астматиков с реакцией бронхов на ИГР деструктивно-цитолитических процессов в лейкоцитах, причастных к экзоцитозу МПО.

Катализируемые миелопероксидазой АФГ – более сильные, чем АФК, окислители – модифицируют белки, липиды, нуклеиновые кислоты, ввиду чего белки приобретают антигенные свойства, а окисление липидов приводит к появлению хематтрактантов для гранулоцитов и фагоцитов, с лавинообразным нарастанием оксидантов и образованием «порочного круга» оксидативного стресса (С.К. Соодаева, 2012). Одним из индукторов эскалации оксидативного стресса, персистенции воспаления в бронхах у больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул можно рассматривать лейкоцитарную пероксидазу. Окислительная активность лейкоцитарной пероксидазы в бронхиальном воспалении зависит главным образом от воздействия провоспалительных цитокинов. При этом функционирование продуцирующей пероксидазу нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов определяется синергическими и антагонистическими отношениями между представителями Th1- и Th2-

профилей цитокинов, дисбаланс которых в дыхательных путях больных бронхиальной астмой способствует развитию осмотической гиперреактивности, поддерживаемой оксидативным стрессом и воспалением.

5.8. Роль эозинофильного компонента воспаления бронхов и перекисного окисления липидов у больных бронхиальной астмой в развитии реакции дыхательных путей на физическую нагрузку

Бронхоспазм в ответ на физическую нагрузку регистрируется у значительной части больных бронхиальной астмой и тесно связан с тяжестью и низким контролем заболевания (J.M. Weiler et al., 2010; Л.Г. Нахамчен и др., 2016). В основе его формирования лежит снижение влажности вдыхаемого воздуха и увеличение уровня минутной вентиляции, достигаемого и поддерживаемого в течение физической нагрузки. Гипервентиляция сухого воздуха и гиперосмолярность жидкости, покрывающей дыхательные пути, индуцируют приток в клетки бронхов ионов Na^+ и Cl^- . Пассивно следующий за Cl^- внутрь тучных клеток Ca^{2+} вызывает их дегрануляцию и высвобождение провоспалительных медиаторов и бронхоконстрикторов – гистамина, лейкотриенов и простагландинов (J.M. Weiler et al., 2010).

Как было показано выше, увеличение концентрации метаболитов ПОЛ в конденсате выдыхаемого воздуха и сыворотке крови и нарушение баланса в оксидантно-антиоксидантной системе у больных бронхиальной астмой с осмотической гиперреактивностью дыхательных путей причастно к утяжелению реакции бронхов на аэрозольные стимулы и потере контроля над заболеванием (Ю.М. Перельман и др., 2014). Взаимосвязь между физическими упражнениями и окислительным стрессом является чрезвычайно сложной, в зависимости от режима, интенсивности и продолжительности упражнений. Регулярные умеренные физические нагрузки оказываются полезными, чего не скажешь об однократных стрессовых нагрузках, которые приводят к

усилению окислительного стресса и нарушению в регуляции эндогенной антиоксидантной защиты (гормесис) (A. Yavari et al., 2015).

Генераторами окислительных процессов, эффекторами воспаления и продуцентами катализатора образования АФГ и свободных радикалов – миелопероксидазы (МПО) – являются гранулярные лейкоциты: нейтрофилы и эозинофилы, находящиеся в центре внимания в качестве связующего звена базисных явлений патогенеза бронхиальной астмы – воспаления и оксидативного стресса. Поскольку постнагрузочный бронхоспазм характеризуется эозинофильным типом воспаления, сопровождаясь гиперпродукцией эозинофилами дыхательных путей мощных бронхоконстрикторов – цистеиниловых лейкотриенов (N. Barnes, 2000; Н.П. Княжеская, 2007), в проблеме исследования постнагрузочного бронхоспазма у больных бронхиальной астмой наибольший интерес представляют инфильтрирующие бронхи эозинофилы. Значение структурной организации эозинофильного звена воспаления бронхов, ферментативной функции эозинофилов, а также роль взаимосвязи оксидантной активности миелопероксидазы и процессов липопероксидации в формировании патологической реакции дыхательных путей на физическую нагрузку мало исследованы.

Для того чтобы определить влияние структурно–функционального профиля эозинофильного компонента бронхиального воспаления во взаимосвязи с уровнем образования недоокисленных продуктов перекисного окисления липидов был исследован клеточный состав ИМ и процессы перекисного окисления липидов в КВВ у больных с постнагрузочным бронхоспазмом и без такового. Оказалось, что процентное число эозинофилов в составе ИМ у больных бронхиальной астмой обеих исследованных групп статистически достоверно превышало количество клеток в контроле ($0,1 \pm 0,08\%$), с преобладающей тенденцией к увеличению у больных с чрезмерной реакцией на дозированную физическую нагрузку ($23,2 \pm 4,3$, $p < 0,001$ и $16,1 \pm 2,9\%$, $p < 0,001$, соответственно).

Как известно, формирование постнагрузочного бронхоспазма происходит на фоне вовлечения в процесс кондиционирования возду-

ха периферических дыхательных путей, обладающих наибольшим содержанием тучных клеток, коррелирующим с высокой концентрацией в слизистой оболочке эозинофилов и развитием бронхиальной гиперреактивности (J. Bystrom et al., 2011). Тучные клетки продуцируют и секретируют IL-5, PAF – фактор агрегации тромбоцитов и стимуляции секреции гистамина, LTB₄, вызывающий агрегацию и дегрануляцию нейтрофилов, а также активацию лейкоцитов и миграцию нейтрофилов и эозинофилов в очаг воспаления (J. Bystrom et al., 2011). При этом индуцируется высвобождение эозинофильного катионного протеина (ECP), который, в свою очередь, стимулирует тучно-клеточный синтез и секрецию гистамина и простагландина D₂ (PGD₂), являющегося хемоаттрактантом для эозинофилов и Th2 лимфоцитов посредством связывания рецептора CRTN2 (J.P. Parsons, J.G. Mastronarde, 2005; J. Bystrom et al., 2011).

Таким образом, в литературе эозинофилы рассматриваются не только как продуценты цитотоксичного ECP, разрушающего эпителий бронхов и регулирующего пролиферацию T- и B-лимфоцитов (J. Bystrom et al., 2011), но и как клетки, обеспечивающие бронхоконстрикторные механизмы. К последним, прежде всего, относится хорошо изученный механизм синтеза эозинофилами цистениловых лейкотриенов (LTC₄, LTD₄ и LTE₄) (Н.П. Княжеская, 2007; N. Barnes, 2000), гиперпродукция которых зарегистрирована в дыхательных путях после физической нагрузки у лиц с развитием постнагрузочного бронхоспазма (Y.S. Jin, 2000). Другим механизмом является инициация выработки бронхоконстрикторных медиаторов в результате взаимодействия с тучными клетками (J. Bystrom et al., 2011), насыщающими дыхательные пути <math><12\text{-го}</math> порядка (диаметром <math><1\text{ мм}</math>), которые вовлекаются в кондиционирование воздуха при выполнении дозированной физической нагрузки.

На рост провоспалительной и прооксидантной активности эозинофилов у пациентов с постнагрузочным бронхоспазмом указывала тенденция к увеличению по сравнению со здоровыми СЦК миелопероксидазы: $103,0 \pm 10,6$ и $84,8 \pm 4,1$ пикселей, соответственно ($p > 0,05$),

отражающая усиление синтеза и накопление пероксидазы в гранулах.

С интенсификацией лизосомального синтеза и внутригранулярного депонирования МПО связаны процессы дегрануляции, деструкции и цитолиза эозинофилов, обеспечивающие персистенцию воспаления и поддержание оксидативного стресса. Выброс фермента во внеклеточную среду направлен на конвертацию оксидативного стресса в стресс галогенирующий. Наиболее высокие по отношению к контролю показатели деструкции клеток, обеспечивающей выброс МПО, наблюдались у пациентов с постнагрузочным бронхоспазмом (ИДК $0,46 \pm 0,03$ и $0,22 \pm 0,06$, соответственно, $p < 0,01$). Деструктивные изменения эозинофилов индуцированной мокроты у пациентов, не имевших реакции на стимул, также превышали контрольные (ИДК $0,44 \pm 0,02$, $p < 0,01$).

Цитолиз, обусловленный чрезмерной активацией ферментов лизосом, в большей мере, чем деструкция, ассоциируется с воздействием повреждающих факторов, приводящих к нарушению целостности клеточных мембран, изоляцией клетки от её окружения с последующим развитием или прогрессированием воспаления (В.А. Невзорова и др., 2006). Интенсивность цитолиза эозинофилов индуцированной мокроты в обеих группах больных существенно повышалась ($0,31 \pm 0,03$, $p < 0,001$ и $0,31 \pm 0,05$, $p < 0,001$, по сравнению с $0,08 \pm 0,006$ у здоровых лиц).

Неоспоримым фактом является сопряженность пероксидазной активности эозинофилов – синтеза и депонирования МПО, деструкции и цитолиза клеток, ассоциированных с оксидативным и галогенирующим стрессом. Важнейшим источником свободных радикалов и индуктором ПОЛ среди продуктов пероксидазного катализа и образования АФГ в ходе галогенирующего стресса служит НОСІ (А.Д. Luster, А.М. Tager, 2004; О.М. Панасенко и др., 2013).

Концентрация метаболитов перекисного окисления липидов в дыхательных путях больных бронхиальной астмой в процессе бронхопровокации в форме дозированной физической нагрузки может служить объективным свидетельством различий в степени выражен-

ности окислительных процессов и воспаления у лиц противоположными типами реакции бронхов на (табл. 29). Наряду с найденными изменениями в ИМ у больных, активно реагирующих на пробу с дозированной физической нагрузкой, в конденсате выдыхаемого воздуха был найден более высокий уровень неокисленных липидов и их окисленных производных. Базовая величина E206, отражающая содержание неокисленных липидов, у них была существенно выше, чем у больных с отсутствием реакции на физическую нагрузку и у здоровых лиц (табл. 29).

Таблица 29. Показатели ПОЛ в КВВ у больных бронхиальной астмой и у здоровых людей до бронхопровокационной пробы с дозированной физической нагрузкой (M±m).

Показатели	Больные с отсутствием реакции на ДФН	Больные с постнагрузочным бронхоспазмом	Здоровые
E206 мл	0,19±0,01	0,29±0,04; p=0,008	0,20±0,03
E233мл	0,06±0,01***	0,07±0,007***	0,03±0,002
E278мл	0,02±0,005**	0,01±0,002**	0,007±0,001
E233/E206	0,25±0,013	0,32±0,034*; p=0,046	0,22±0,03
E278/E206	0,06±0,006	0,057±0,007	0,05±0,01

Примечание: p – достоверность различий между группами больных бронхиальной астмой, звездочка – достоверность различий в сравнении с контролем.

Аналогичная тенденция была получена и для величины E233, отражающей содержание диеновых конъюгатов в конденсате выдыхаемого воздуха, а также индекса окисленности (E233/E206), который оказался существенно выше по отношению к больным, не имевшим реакции, и здоровым. В ответ на бронхопровокационную пробу происходило увеличение этого показателя, тогда как у больных без гиперреактивности и здоровых наблюдалось отсутствие какой либо динамики E233/E206 и E278/E206 (рис. 53).

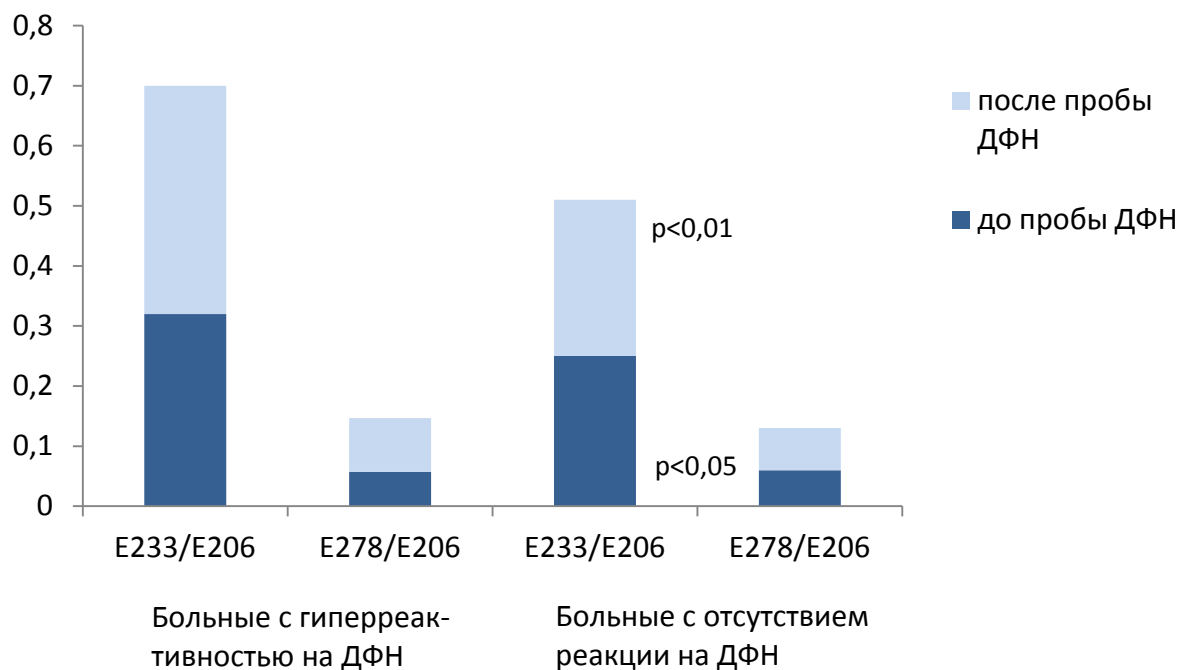


Рис. 53. Изменение индексов окисленности липидов в конденсате выдыхаемого воздуха у больных бронхиальной астмой до и после выполнения дозированной физической нагрузки.

Анализируя полученные данные, можно предположить, что у больных бронхиальной астмой, имеющих постнагрузочный бронхоспазм, в ряду метаболитов перекисного окисления липидов в дыхательных путях ведущая роль в поддержании более высокого уровня оксидативного и галогенирующего стресса исходно принадлежит диеновым конъюгатам. Если рассматривать аспект участия миелопероксидазы и активных форм галогенов в процессах перекисного окисления липидов, то необходимо обратить внимание на свободнорадикальный механизм взаимодействия первичных активных форм галогенов с ненасыщенными связями ацильных цепей фосфолипидов, благодаря которому происходит образование диеновых конъюгатов и гидропероксидов (A.D. Luster, A.M. Tager, 2004).

Гидроперекиси липидов считаются традиционным индикатором перекисного окисления липидов в биологических системах. Роль иницирующего звена АФГ-индуцированного перекисного окисления липидов отводится реакции HOCl с гидропероксидной группой, все-

гда содержащейся в том или ином количестве в ненасыщенном липиде в результате его естественного окисления, с образованием пероксильных радикалов, затем трансформирующихся в алкоксильные радикалы (A.D. Luster, A.M. Tager, 2004; O.M. Панасенко и др., 2013).

Доказано, что миелопероксидаза в присутствии своих субстратов (H_2O_2 и Cl^-) разрушает активированный гидропероксид с образованием O-центрированных радикалов, идентифицированных как пероксильный и алкоксильный. В случае с гидропероксидом жирной кислоты допущена возможность образования, помимо O-центрированных радикалов, некоторого количества синглетного кислорода (O.M. Панасенко и др., 2013). Ингибиторный анализ, проведенный с использованием «ловушек» HOCl, перехватчиков свободных радикалов и ингибиторов миелопероксидазы, показал, что разрушение гидропероксидной группы в присутствии изолированной миелопероксидазы или активированных лейкоцитов обусловлено непосредственной работой фермента. Это позволило нам сделать вывод о реально имеющем место зависимом от миелопероксидазы HOCl-индуцированном перекисном окислении липидов.

Отсюда следует, что индукция перекисного окисления липидов, сопряженная с интенсивным синтезом и секрецией в экстрацеллюлярное пространство эозинофильной пероксидазы, у больных бронхиальной астмой с развитием бронхоспазма на физическую нагрузку соответствует современной концепции механизма возникновения избыточной бронхоспастической реакции на основе активации оксидативного стресса, сопровождающегося гиперпродукцией активных форм кислорода, пероксинитрита, гипохлорита (S.D. Anderson, P. Kippelen, 2008; С.К. Соодаева, И.А. Климанов, 2009; Л.Ю. Никитина и др., 2012).

Более высокому уровню E206, E233 в конденсате выдыхаемого воздуха и увеличению индекса окисленности липидов E233/E206 для диеновых конъюгатов, отражающих мобилизацию процессов свободнорадикального окисления в бронхах, соответствовали наиболее значимые показатели количества эозинофилов, уровней синтеза миело-

пероксидазы в азурофильных гранулах клеток и клеточной секреторной активности у больных с постнагрузочным бронхоспазмом.

Прослеживалась четкая связь между индексом интенсивности цитолиза клеток эозинофилов в индуцированной мокроте, базовой концентрацией E206, E233/E206, E278/E206 и последующей реакцией бронхов ($\Delta\text{ОФВ}_1$) на дозированную физическую нагрузку ($r=-0,83$; $p<0,01$; $r=-0,39$, $p<0,01$; $r=-0,46$, $p<0,01$; $r=-0,34$, $p<0,01$, соответственно).

Следовательно, у больных бронхиальной астмой с постнагрузочным бронхоспазмом в воспалительном инфильтрате дыхательных путей активируется ферментативно-синтетическая и секреторная функция эозинофильного компонента на фоне роста количества популяции эозинофилов. Постнагрузочный бронхоспазм сопровождается интенсификацией образования недоокисленных продуктов перекисного окисления липидов в дыхательных путях больных бронхиальной астмой. Структурно-функциональный профиль эозинофильного компонента воспаления и уровень перекисного окисления липидов оказывают влияние на формирование реакции дыхательных путей в ответ на дозированную физическую нагрузку и маркируют возможность развития данного типа бронхоконстрикции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов гиперреактивности дыхательных путей – непростая задача. Прежде всего, это обусловлено многообразием воздействующих на респираторный тракт внешних стимулов, эффекты которых часто комбинируются в естественной среде. В свою очередь, это подразумевает необходимость изучения обширного пула рецепторов, экспрессированных на клетках эпителия, секреторирующих клетках, нервных окончаниях в толще слизистой оболочки бронхов, а также на клетках иммунной защиты, персистирующих в дыхательных путях. При этом каждый из рецепторов может отвечать за восприятие множества физических и химических, экзогенных и эндогенных стимулов. С другой стороны, сам респираторный тракт характеризуется наличием определенного «фона» врожденных особенностей и приобретенных нарушений, преимущественно в условиях патологии модулирующих рецепцию внешних стимулов и клеточный ответ на них.

Несмотря на это, изучение патогенеза гиперреактивности и гиперчувствительности бронхиального дерева на непрямые стимулы представляет исключительный интерес по ряду причин. Понимание механизмов формирования данных явлений у здоровых лиц поможет предотвратить развитие патологических реакций респираторного тракта и повысить устойчивость организма при пребывании и выполнении физических нагрузок в неблагоприятных климатических условиях с высокой или низкой температурой либо влажностью окружающего воздуха. Исследование гиперреактивности дыхательных путей в условиях патологии, например, у больных бронхиальной астмой, еще более важно, поскольку сама гиперреактивность, наряду с хроническим воспалением, представляет собой суть данного заболевания. Таким образом, знание механизмов гиперреактивности эквивалентно знанию механизмов патогенеза заболевания в целом.

Выполненная работа заложила фундамент в понимание причин и принципов формирования реакции дыхательных путей на осмотические стимулы. Влажность, наряду с температурой, является неотъемлемой характеристикой атмосферного воздуха, поступающего в дыхательные пути. При этом большой процент больных, предъявляющих респираторные жалобы при контакте с влажным или сухим воздухом, обосновывает клиническую релевантность проведенного исследования. Высокая распространенность осмотических реакций респираторного тракта также подтверждается бронхопровокационными пробами с осмотическими стимулами. Гиперреактивность дыхательных путей на ингаляцию дистиллированной воды (гипоосмотический стимул) обнаруживается в 37% случаев, а на ингаляцию гипертонического раствора и физическую нагрузку (гиперосмотические стимулы) – в 33% и 18% соответственно. Примечательно, что в ряде случаев отмечается изолированная гиперреактивность дыхательных путей лишь на определенный вид осмотической стимуляции, что, возможно, свидетельствует о наличии нарушений специфических механизмов осмотической рецепции. При этом данные распределения сочетанных реакций указывают на относительную патогенетическую общность гипо- и гиперосмотической гиперреактивности, а также гипоосмотической и холодовой гиперреактивности дыхательных путей, но обособленность механизмов постнагрузочного бронхоспазма, для которого в большей степени характерно изолированное проявление.

Не вызывает сомнений, что в формировании осмотической гиперреактивности дыхательных путей играют роль как специфические, так и неспецифические факторы. При этом первые в наибольшей мере существенны на ранних этапах развития заболевания, по мере его прогрессирования специфичность реакций дыхательных путей снижается. Тем не менее, не исключено, что сама бронхиальная гиперреактивность может являться причиной прогрессирования заболевания. Как было показано, среди больных бронхиальной астмой осмотическая гиперреактивность ассоциируется с более низкими показателями контроля заболевания.

Среди специфических механизмов формирования осмотической гиперреактивности наиболее очевидным фактором является врожденная предрасположенность. Нами впервые были изучены вариации структуры генов осмочувствительных рецепторов, представленных катионными каналами с транзиторным рецепторным потенциалом – TRPV1, TRPV2 и TRPV4. Однонуклеотидные полиморфизмы гена *TRPV4*, и в особенности, *TRPV2* в наибольшей степени ассоциированы с гипоосмотической гиперреактивностью дыхательных путей в ответ на ингаляцию аэрозоля дистиллированной воды. Помимо возможностей прогнозирования статуса гипоосмотической гиперреактивности с использованием генетических предикторов, это является косвенным доказательством участия катионных каналов TRPV2 и TRPV4 в этиопатогенезе данного типа гиперреактивности, а возможно, и бронхиальной астмы в целом.

Вероятное нарушение осмотической рецепции у больных с гиперреактивностью сопровождается активизацией процессов перекисного окисления липидов с одновременным снижением антиоксидантной защиты, а также воспалительной реакцией респираторного тракта. Установлено, что гиперреактивность дыхательных путей на гипо- и гиперосмотические стимулы характеризуется различными паттернами клеточного и гуморального воспаления. Так, по данным анализа индуцированной мокроты, гипоосмотическая гиперреактивность сопровождается преимущественно эозинофильным воспалением, со снижением внутриклеточного содержания миелопероксидазы, а гиперреактивность на гиперосмотический стимул характеризуется преобладанием нейтрофилов в воспалительном инфильтрате с повышенным накоплением миелопероксидазы внутри клеток. При этом во всех случаях среди лиц с гиперреактивностью отмечается повышенная функциональная активность клеток с интенсификацией процессов их деструкции и цитолиза.

Дальнейшие исследования, прежде всего, должны быть направлены на уточнение пула осмочувствительных рецепторов респираторного тракта и определение их функциональной значимости. Также

важным видится выяснение сигнальных механизмов, опосредующих эффекты активации осмочувствительных каналов TRPV на функцию клеток бронхиального эпителия, лейкоцитов и нервных окончаний в аспекте продукции ими медиаторов воспаления, оказывающих негативное влияние на течение заболевания и затрудняющее его контроль. Наконец, большой интерес представляет изучение так называемых «парадоксальных» реакций, при которых воздействие осмотических стимулов приводит к увеличению проходимости дыхательных путей с улучшением функции внешнего дыхания. К сожалению, проведение исследований по данному направлению затруднено в связи с редкостью наблюдений подобного рода. При этом понимание механизмов формирования таких реакций, в будущем, возможно, позволило бы добиться прогресса в лечении бронхиальной астмы за счет использования принципиально новых классов фармакологических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдрахманова Л.М., Фархутдинов У.Р., Фархутдинов Р.Р. Особенности экспрессии активных форм кислорода клетками крови у больных хроническим бронхитом // Тер. архив. 2001. № 3. С. 45-48.
2. Азизова О.А., Гао Л.Н., Думикян А.Ш. Прогностическое значение динамики показателей оксидантного стресса у больных со стабильной ишемической болезнью сердца // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2011. Т. 4, № 1. С. 4-9.
3. Алякринская М.Д., Комар С.И. Клиническое значение определения продуктов свободнорадикального окисления в конденсате выдыхаемого воздуха у больных внегоспитальной пневмонией// Известия Челябинского науч. центра. 2007. Вып. 1 (35). С. 179-182.
4. Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Исследование конденсата выдыхаемого воздуха в пульмонологии // Пульмонология. 2002. № 2. С. 57-63
5. Анаев Э.Х., Авдеев С.Н., Чучалин А.Г. Исследование рН конденсата выдыхаемого воздуха при воспалительных заболеваниях легких // Пульмонология. 2005. № 9. Р. 75-79
6. Анапольская Л.Н., Копзнев И.Д. Климатические параметры Восточно-Сибирского и Дальневосточного экономических районов: научно-справочное пособие. Л.: Гидрометеиздат, 1979. 391 с.
7. Афанасьева Е.Ю., Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Нахамчен Л.Г. Сравнительная характеристика клинических и функциональных особенностей формирования гипо- и гиперосмолярной реактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2015. Вып. 56. С. 8-13.
8. Болевич С.Б. Бронхиальная астма и свободнорадикальные процессы. Патогенетические, клинические и терапевтические аспекты. М.: Медицина, 2006. 253 с.
9. Бородин Е.А., Штарберг М.А. Конденсат выдыхаемого воздуха как объект для биохимического исследования // Матер. IX международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2015). Благовещенск, 2015. С. 115-117.
10. Бородин Е.А., Штарберг М.А., Приходько А.Г., Колосов В.П., Пере-

- льман Ю.М. Анализ продуктов окислительной модификации липидов в конденсате выдыхаемого воздуха при исследовании осмотической реактивности дыхательных путей // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. № 9. С. 119-120.
11. Буков В.А., Фельбербаум Р.А. Рефлекторные влияния с верхних дыхательных путей. М.: Медицина, 1980. 272 с.
 12. Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами // Иммунология. 2000. № 5. С. 11-17.
 13. Величковский Б.Т. Свободнорадикальное окисление, как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды // Вестник РАМН. 2001. № 6. С. 45-53.
 14. Владимиров Ю.А. Роль нарушений свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1989. № 4. С. 7-19.
 15. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. 1998. № 7. С. 48-49.
 16. Воейков В.Л. Биофизико-химические аспекты старения и долголетия // Успехи геронтологии. 2002. Вып. 9. С. 54-66.
 17. Гармаш С.А. Образование активных форм кислорода при совместном действии низких концентраций ионов уранила и ряда физических факторов // Фундаментальные исследования. 2012. № 9-4. С. 961-964.
 18. Геронина С.А. Показатели липидного обмена, фосфолипидов, системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» у больных хроническим катаральным необструктивным бронхитом // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2004. Вып. 19. С. 22-24.
 19. Горудко И.В., Костевич В.А., Соколов А.В., Шамова Е.В., Буко И.В., Константинова Е.Э., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. Функциональная активность нейтрофилов при сахарном диабете и ишемической болезни сердца: роль миелопероксидазы в развитии окислительного стресса // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 154, № 7. С. 30-32.
 20. Горячкина Н.М., Чжоу С.Д., Ли Ц. Значение показателей оксидативного стресса у больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2010.

- Вып. 38. С. 12-15.
21. Горячкина Н.М., Чжоу С.Д., Ли Ци., Бородин Е.А., Перельман Ю.М. Клиническое значение определения показателей оксидативного стресса в конденсате выдыхаемого воздуха у больных бронхиальной астмой // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2011. Вып. 42. С. 8-12.
 22. Дугарова И.Д., Анаев Э.Х., Оспельникова Т.П., Чучалин А.Г. Экспрессия цитокинов в конденсате выдыхаемого воздуха и ее взаимосвязь с клинико-функциональными показателями бронхиальной астмы // Пульмонология. 2010. № 3. С. 57-61.
 23. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньцкая Е.Б. Окислительный стресс (биохимический и патофизиологический аспекты). М., 2000. С. 56-58.
 24. Зинчук В.В., Жадько Д.Д. Эффект сауны на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс у нетренированных лиц // Физиология человека. 2012. Т. 38, № 5. С. 112-119.
 25. 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.
 26. 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.
 27. Каган В.Е., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов // Итоги науки и техники, сер. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1986. Т. 18. 195 с.
 28. Кармен Н.Б., Абдуллаева М.А., Токарева Л.В. Окислительный стресс в формировании гипоксии при тяжёлой бронхиальной астме // Medline.ru. 2011. Т. 12, №2-1. С. 665-678.
 29. Киселева Р.Е., Федотова Г.Г. Апоптоз и его роль в ответе нейтрофилов // Современные наукоемкие технологии. 2005. № 8. С. 75-76.
 30. Киселева Р.Е., Федотова Г.Г. Деструктивные изменения в лейкоцитах при бронхолегочной патологии // Современные наукоемкие технологии. 2007. № 1. С. 81-82.
 31. Кисилевич Р.Ж., Скварко С.И. Определение витамина Е в сыворотке

- крови // Лабораторное дело. 1972. № 8. С. 473–475.
32. Климанов И.А., Соодаева С.К., Лисица А.В., Кудрявцев В.Б., Чучалин А.Г. Стандартизация преаналитического этапа исследования конденсата выдыхаемого воздуха // Пульмонология. 2006. № 7. С. 53-55.
33. Княжеская Н.П. Антагонисты лейкотриеновых рецепторов: новые представления о противовоспалительной терапии бронхиальной астмы // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2007. № 1. С. 61–64.
34. Лебедько О.А., Гусева О.Е., Козлов В.К. Нарушение оксидативного метаболизма при хронических обструктивных заболеваниях лёгких у детей // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2007. Вып. 27. С. 12-13.
35. Лебедько О.А., Хелимская И.В., Сусидко В.А. Влияние профессиональных факторов на показатели свободнорадикальных процессов у работников Дальневосточной железной дороги // Медицина труда и промышленная экология. 2011. № 2. С. 13-15
36. Лисица А.В., Соодаева С.К., Климанов И.А. Динамика показателей окислительного стресса у больных, переносящих обострение бронхиальной астмы, на фоне ингаляционной терапии липосомальными препаратами // Пульмонология. 2010. № 1. С. 74-79.
37. Матвеева Л.А. Местная защита респираторного тракта у детей. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1993. 276 с.
38. Маянский А.Н. НАДФ-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция // Цитокины и воспаление. 2007. Т. 6, № 3. С. 3–13.
39. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1983. 256 с.
40. Миррахимов М.М., Колосов В.П., Сооронбаев Т.М., Перельман Ю.М. Респираторная система в экстремальных природных условиях. Бишкек: Турар, 2011. 140 с.
41. Наумов Д.Е., Перельман Ю.М., Максимов В.Н., Колосов В.П., Воевода М.И., Чжоу С.Д., Ли Ц. Роль полиморфизма гена $\beta 2$ -адренорецепторов в формировании холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 154, № 7. С. 83-86.
42. Наумов Д.Е., Перельман Ю.М., Колосов В.П., Максимов В.Н., Воевода М.И., Колосов А.В., Чжоу С.Д., Ли Ц. Генетический полиморфизм термочувствительных катионных каналов TRPM8 как фактор пред-

- расположенности к холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2012. Вып. 45. С.8-14.
43. Наумов Д.Е., Колосов В.П., Перельман Ю.М., Приходько А.Г. Влияние полиморфизмов гена TRPV4 на формирование осмотической гиперреактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой // Доклады Академии наук. 2016. Т. 469, № 2. С. 252-255.
44. Нахамчен Л.Г., Перельман Ю.М., Приходько А.Г., Ульянычев Н.В., Воропаева Р.В. Функциональная характеристика и клинические проявления реакции дыхательных путей на физическую нагрузку у больных бронхиальной астмой // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2016. Вып. 61. С. 8–15.
45. 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.
46. Некрасов Э.В., Перельман Ю.М., Приходько А.Г., Захарова Э.В., Макарова Г.А. Секреция муцинов слизистой носа в ответ на гипервентиляцию холодным воздухом у больных бронхиальной астмой с разной степенью тяжести и контролируемости заболевания // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып. 53. С. 41-49.
47. Непряхина О.К., Кузнецова А.Ю., Лямзаев К.Г., Изюмов Д.С., Плетюшкина О.Ю., Черняк Б.В., Скулачев В.П. Активные формы кислорода, генерируемые в митохондриях, индуцируют фрагментацию митохондриального ретикулума в клетках HELA // Доклады Академии наук. 2008. Т. 420, № 4. С. 559-561.
48. Нестерова И.В., Колесникова Н.В. Цитокиновая регуляция и функционирующая система нейтрофильных гранулоцитов // Гематология и трансфузиология. 1999. Т. 44, № 2. С. 43-51.
49. 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.
50. Одиреев А.Н., Чжоу С.Д., Ли Ц., Колосов В.П., Луценко М.Т. Нарушения мукоцилиарного клиренса при бронхиальной астме // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2010. Вып. 37. С. 15–21.

51. Панасенко О.М., Чеканов А.В., Власова И.И., Соколов А.В., Агеева К.В., Пулина М.О., Черкалина О.С., Васильев В.Б. Влияние церулоплазмина и лактоферрина на хлорирующую активность лейкоцитарной миелопероксидазы. Изучение методом хемилюминесценции // Биофизика. 2008. Т. 53, № 4. С. 573-581.
52. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Галогенирующий стресс и его биомаркеры // Вестник РАМН. 2010. № 1. С. 27-39.
53. 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.
54. Перельман Н.Л. Качество жизни и прогнозирование контроля течения бронхиальной астмы // Информатика и системы управления. 2010. № 2 (24). С. 157-159.
55. Перельман Н.Л. Качество жизни у больных бронхиальной астмой с осмотической гиперреактивностью дыхательных путей // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2016. Вып. 59. С. 16-20.
56. Перельман Ю.М. Актуальные аспекты экологической физиологии дыхания // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2001. Вып. 8. С. 20-26.
57. Перельман Ю.М. Проблемы внешнесредовых воздействий на дыхательную систему // Механизмы этиопатогенеза и пути коррекции неспецифических заболеваний дыхательной системы. Благовещенск: ГУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН, 2005. Т. 1. С. 95-111.
58. Перельман Ю.М., Колосов В.П., Приходько А.Г. Влияние климатических факторов на формирование и течение хронической обструктивной болезни легких // Хроническая обструктивная болезнь легких. М.: Издательский дом «Атмосфера», 2008. С. 61-81.
59. Перельман Ю.М., Прилипко Н.С. Гиперреактивность дыхательных путей при хроническом бронхите // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 1998. Вып. 1. С. 28-34.
60. Перельман Ю.М., Приходько А.Г. Методика комбинированной диагностики нарушений кондиционирующей функции и холодовой гиперреактивности дыхательных путей // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2002. Вып. 12. С. 22-28.
61. Перельман Ю.М., Приходько А.Г., Бородин Е.А., Ушакова Е.В. Роль оксидативного стресса в реакции дыхательных путей на гипоосмоляр-

- ный стимул у больных бронхиальной астмой // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып. 54. С. 17-22.
62. Перельман Ю.М., Ульянычев Н.В., Приходько А.Г., Ульянычева В.Ф. Комплекс комбинированной диагностики холодовой гиперреактивности дыхательных путей и кондиционирующей функции легких // Патент на полезную модель № 119988. Дата регистрации 27.02.2012.
63. 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 // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып. 53. С. 50–56.
64. Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Зиновьев С.В., Ушакова Е.В., Макарова Г.А., Наумов Д.Е. Клеточный профиль индуцированной мокроты, уровень миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы крови у больных бронхиальной астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на гипоосмолярный стимул // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2015. Вып. 57. С. 8-14.
65. Пирогов А.Б., Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Зиновьев С.В., Афанасьева Е.Ю. Фенотипические особенности воспаления бронхов у больных бронхиальной астмой с различными типами реакции дыхательных путей на дистиллированную воду и холодный воздух // Бюл. физиол. патол. дыхания. 2015. Вып. 58. С. 8-14.
66. 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 // Бюл. экспер. биологии и медицины. 2016. Т. 161, № 4. С. 542-546.
67. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Тер. архив. 2005. № 1. С. 82-87.
68. Прилипко Н.С., Перельман Ю.М. Влияние сезонных изменений метеорологических факторов на функцию внешнего дыхания у больных хроническим бронхитом // Бюллетень СО АМН СССР. 1991. № 3. С. 52-57.
69. Приходько А.Г. Реакция дыхательных путей на гипоосмолярный стимул // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2005. Вып. 21. С. 47-52.
70. Приходько А.Г. Реакция дыхательных путей на ингаляцию дистилли-

- рованной воды у больных бронхиальной астмой и хроническим бронхитом // Пульмонология. 2006. № 2. С. 78-82.
71. Приходько А.Г., Макарова Г.А. Иммунологические механизмы в инициации и модулировании холодовой реактивности дыхательных путей // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2009. Вып. 34. С. 13-16.
72. Приходько А.Г., Перельман Ю.М. Респираторный теплообмен и холодовая реактивность дыхательных путей у здоровых людей // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 1999. Вып. 5. С. 11-18.
73. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П. Гиперреактивность дыхательных путей. Владивосток: Дальнаука, 2011. 204 с.
74. 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 гипоосмотический стимулы // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып. 53. С. 36–41.
75. 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 воспаления у больных бронхиальной астмой с изолированной и сочетанной реакцией дыхательных путей на холодный воздух и дистиллированную воду // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып. 54. С. 8-16.
76. Рязанцева Н.В., Жаворонок Т.В., Степовая Е.А., Стариков Ю.В., Агеева Т.С., Митасов В.Я., Соколов Е.Г. Окислительный стресс в модуляции апоптоза нейтрофилов в патогенезе острых воспалительных заболеваний // Бюл. СО РАМН. 2010. Т. 30, № 5. С. 58-63.
77. Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж. Роль цитокинов в воспалительном процессе (сообщение 1) // Сибирский медицинский журнал. 2008. № 6. С. 5–8.
78. Силина Е.В., Румянцева С.А., Болевич С.Б. Закономерности течения свободнорадикальных процессов и прогноз ишемического и геморрагического инсульта // Журнал неврология и психиатрия имени С.С. Корсакова. 2011. Т. 111, № 12 (приложение "Инсульт"). С. 36-42.
79. Смирнова М.Д., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К., Осяева М.К., Свирида О.Н., Ратова Л.Г., Постнов А.Ю., Агеев Ф.Т., Ланкин В.З., Чазова И.Е. Влияние летней жары на показатели окислительного стресса у паци-

- ентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями // Кардиологический вестник. 2013. Т. VIII, № 1 (XX). С. 18-22.
80. Смирнова Н.М., Перельман Ю.М., Приходько А.Г., Бородин Е.А., Баткин И.З. Влияние стандартной базисной терапии на динамику показателей оксидативного стресса у больных бронхиальной астмой с холодной гиперреактивностью дыхательных путей // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2012. Вып. 43. С. 19-22.
81. Соодаева С.К. Окислительный стресс и антиоксидантная терапия при заболеваниях органов дыхания // Пульмонология. 2006. № 5. С. 122-126.
82. Соодаева С.К. Свободнорадикальные механизмы повреждения при болезнях органов дыхания // Пульмонология. 2012. № 1. С. 5-10.
83. Соодаева С.К., Климанов И.А. Нарушения окислительного метаболизма при заболеваниях респираторного тракта и современные подходы к антиоксидантной терапии // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2009. № 1. С. 34–38.
84. Соодаева С.К., Климанов И.А. Изменение маркеров оксидативного стресса при атопии и современные методы коррекции окислительного метаболизма // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2009. № 3. С. 47-50.
85. Старикова Э.А., Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Фрейдлин И.С., Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю. Изменения поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток под влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов // Медицинская иммунология. 2003. Т. 5, № 1-2. С. 39-48.
86. Таганович А.Д. Получение конденсата выдыхаемого воздуха и анализ маркеров заболеваний легких // Белорусский медицинский журнал. 2002. №2 (2). С. 28-34.
87. Титов В.Н. Роль макрофагов в становлении воспаления, действие интерлейкина-1, интерлейкина-6 и активность гипоталамо-гипофизарной системы (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. 2003. № 12. С. 3–10.
88. Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Шапорова Н.Л. и др. В поисках истины: что такое бронхиальная астма? // Пульмонология. 2015. Т. 25, № 1. С. 5–18.

89. Федосеева Н.М., Перельман Ю.М. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе бронхиальной астмы и гиперреактивности дыхательных путей // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2008. Вып. 29. С. 38-44.
90. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // Иммунология. 2001. № 5. С. 4-7.
91. Фрейдлин И.С., Шейнин Ю.А. Эндотелиальные клетки в качестве мишеней и продуцентов цитокинов // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3, № 4. С. 499-514.
92. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. Пер. с англ. / под ред. Н.С. Кисляк. М.: Медицина, 1983. 318 с.
93. Хижняк Ю.Ю., Колосов В.П., Перельман Ю.М. Сезонная динамика проходимости и реактивности дыхательных путей у больных бронхиальной астмой в условиях муссонного климата // Тихоокеанский медицинский журнал. 2009. № 1. С. 82-84
94. Хрипач Л.В., Ревизова Ю.А., Рахманин Ю.З. Роль свободнорадикального окисления в повреждении генома факторами окружающей среды // Вестник РАМН. 2004. № 3. С. 16-18.
95. Шумянцева В.В., Махова А.А., Булко Т.В., Ших Е.В., Кукес В.Г., Усанов С.А., Арчаков А.И. Влияние антиоксидантов на электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4 // Биомедицинская химия. 2014. Т. 60, Вып. 2. С. 224-234.
96. Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Интерлейкин-18 и его роль в иммунном ответе // Медицинская иммунология. 2005. Т. 7, № 4. С. 355-364.
97. 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. Vol. 57, № 9. P. 419-429.
98. Alenmyr L., Herrmann A., Högestätt E.D. et al. TRPV1 and TRPA1 stimulation induces MUC5B secretion in the human nasal airway in vivo // Clin. Physiol. Funct. Imaging. 2011. Vol. 31, № 6. P. 435-444.
99. Alfieri R.R., Petronini P.G., Bonelli M.A., Caccamo A.E., Cavazzoni A., Borghetti A.F., Wheeler K.P. Osmotic regulation of ATA2 mRNA expression and amino acid transport System A activity // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. Vol. 283, № 1. P. 174-178.

100. Alvarez D.F., King J.A., Weber D., Addison E., Liedtke W., Townsley M.I. Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury // *Circ. Res.* 2006. Vol. 99, № 9. P. 988-995.
101. Anderson S.D. «Indirect» challenges from science to clinical practice // *Eur. Clin. Respir. J.* 2016. Vol. 3:31096.
102. Anderson S.D., Kippelen P. Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. Vol. 122. P. 225–235.
103. Andreasen C.B. Bronchoalveolar lavage // *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2003. Vol. 33, № 1. P. 69-81.
104. Antus B. Oxidative stress markers in sputum // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016; 2016:2930434.
105. Antczak A., Piotrowski W., Marczak J., Ciebiada M., Gorski P., Barnes P.J. Correlation between eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid and in exhaled breath condensate // *Dis Markers.* 2011. Vol. 30, №5. P. 213-220.
106. Aramburu J., Drews-Elger K., Estrada-Gelonch A., Minguillón J., Moranchó B., Santiago V., López-Rodríguez C. Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5 // *Biochem. Pharmacol.* 2006. Vol. 72, № 11. P. 1597-1604.
107. ATS/ACCP statement on cardiopulmonary exercise testing // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003. Vol. 167. P. 211-277.
108. 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., Lusis A.J., Moore K.P., Freeman B.A. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration // *J. Clin. Invest.* 2001. Vol. 108, № 12. P. 1759-1770.
109. Bandyopadhyay A., Roy P.P., Saha K. et al. Usefulness of induced sputum eosinophil count to assess severity and treatment outcome in asthma patients // *Lung India.* 2013. Vol. 30, № 2. P. 177–123.
110. Barnes N. Effects of antileukotrienes in the treatment of asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. Vol. 161. P. 73–76.
111. Barnes P.J. Reactive oxygen species and airway inflammation // *Free Rad. Biol. Med.* 1990. № 9. P. 235–243.

112. Barnes P.J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010. Vol. 120, № 2-3. P. 76-85.
113. Bartoli M.L., Novelli F., Costa F., Malagrino L., Melosini L., Bacci E., Cianchetti S., Dente F.L., Di Franco A., Vagaggini B., Paggiaro P.L. Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases // *Mediators Inflamm.* 2011; 2011:891752.
114. Bauernschmitt H.G., Kinne R.K. Metabolism of the 'organic osmolyte' glycerophosphorylcholine in isolated rat inner medullary collecting duct cells. I. Pathways for synthesis and degradation // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Vol. 1148, № 2. P.331-341.
115. Baxter M., Birrell M.A., Belvisi M.G. The role of TRPV1 in tobacco smoke induced airway inflammation // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012. Vol. 185: A6410.
116. 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.
117. Berry M., Morgan A., Shaw D.E. Parker D., Green R., Brightling C., Bradding P., Wardlaw A.J., Pavord I.D. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma // *Thorax.* 2007. Vol. 62, № 12. P. 1043–1049.
118. Bessac B.F., Fleig A. TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells // *J. Physiol.* 2007. Vol. 582, Pt. 3. P. 1073-1086.
119. Bikov A., Gajdócsi R., Huszár É., Szili B., Lázár Z., Antus B., Losonczy G., Horváth I. Exercise increases exhaled breath condensate cysteinyl leukotriene concentration in asthmatic patient // *J. Asthma.* 2010. Vol. 47, № 9. P. 1057-1062.
120. Birder L.A., Nakamura Y., Kiss S., Nealen M.L., Barrick S., Kanai A.J., Wang E., Ruiz G., De Groat W.C., Apodaca G., Watkins S., Caterina M.J. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1 // *Nat. Neurosci.* 2002. Vol. 5. P. 856–860.
121. Bíró T., Maurer M., Modarres S., Lewin N.E., Brodie C., Acs G., Acs P., Paus R., Blumberg P.M. Characterization of functional vanilloid receptors

- expressed by mast cells // *Blood*. 1998. Vol. 91, № 4. P. 1332-1340.
122. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. Vol. 37, № 8. P. 911-917.
123. Bolisetty S., Jaimes E.A. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14, № 3. P. 6306–6344.
124. Bonvini S.J., Birrell M.A., Grace M.S., Maher S.A., Adcock J.J., Wortley M.A., Dubuis E., Ching Y.M., Ford A.P., Shala F., Miralpeix M., Tarrason G., Smith J.A., Belvisi M.G. Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 and airway sensory afferent activation: Role of adenosine triphosphate // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. Vol. 138, № 1. P. 249-261.
125. Bonvini SJ, Adcock JJ, Grace MS, Baker KE, Birrell MA, Belvisi MG. 2013. Activation of TRPV4 causes bronchoconstriction: a possible role in respiratory disease? // *Eur. Respir. J.* 2013. Vol. 42, Suppl. 57: 1759.
126. Borodin E.A., Shtarberg M.A., Prikhodko A.G., Kolosov V.P., Perelman J.M. Modified noninvasive method of study of the oxidation of lipids of airways // *Der Pharma Chemica*. 2015. Vol. 7, №11. P. 186-192.
127. Borodin E.A., Prikhodko A.G., Shtarberg M.A., Nahamchen L.G., Afanasyeva E.Yu., Perelman J.M. Dynamics of lipid peroxidation in the exhaled breath condensate in healthy people // *Der Pharma Chemica*. 2016. Vol. 8, № 14. P. 169-173.
128. Brannan J.D. Bronchial hyperresponsiveness in the assessment of asthma control: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance // *Chest*. 2010. Vol. 138, № 2 (Suppl.). P. 11S-17S.
129. Brooks W.M., Lash H., Kettle A.J., Epton M.J. Optimising hydrogen peroxide measurement in exhaled breath condensate // *Redox Rep.* 2006. Vol. 11, № 2. P. 78–84.
130. Burg M.B., Kwon E.D., Kültz D. Regulation of gene expression by hypertonicity // *Annu. Rev. Physiol.* 1997. Vol. 59. P. 437-455.
131. Butler C.A., McQuaid S., Warke T., Stevenson M., Heaney L.G., McGarvey L. The sensory receptor TRPV1 is expressed in human bronchial epithelium and upregulated in refractory (steroid resistant) asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010. Vol. 181: A2490.
132. Bystrom J., Kawa A., Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic

- protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte // *Respir. Res.* 2011. Vol. 12, № 1: 10.
133. Cai X., Yang Y.C., Wang J.F., Wang Q., Gao J., Fu W.L., Zhu Z.Y., Wang Y.Y., Zou M.J., Wang J.X., Xu D.Q., Xu D.G. Transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2), a potential novel biomarker in childhood asthma // *J. Asthma.* 2013. Vol. 50, № 2. P. 209-214.
134. Cameron L., Webster R.B., Stempel J.M., Kiesler P., Kabesch M., Ramachandran H., Yu L., Stern D.A., Graves P.E., Lohman I.C., Wright A.L., Halonen M., Klimecki W.T., Vercelli D. Th2 cell-selective enhancement of human IL13 transcription by IL13-1112C>T, a polymorphism associated with allergic inflammation // *J. Immunol.* 2006. Vol. 177, № 12. P. 8633-8642.
135. Candeias L.P., Patel K.B., Stratford M.R., Wardman P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 333, № 1-2. P. 151-153.
136. Cantero-Recasens G., Gonzalez J.R., Fandos C., Duran-Tauleria E., Smit L.A., Kauffmann F., Antó J.M., Valverde M.A. Loss of function of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) genetic variant is associated with lower risk of active childhood asthma // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 36. P. 27532-27535.
137. Caruccio L., Bae S., Liu A.Y., Chen K.Y. The heat-shock transcription factor HSF1 is rapidly activated by either hyper- or hypo-osmotic stress in mammalian cells // *Biochem. J.* 1997. Vol. 327, Pt. 2. P. 341-347.
138. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway // *Nature.* 1997. Vol. 389. P. 816-824.
139. Caterina M.J., Rosen T.A., Tominaga M., Brake A.J., Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat // *Nature.* 1999. Vol. 398. P. 436-441.
140. Chetta A., Foresi A., Del Donno M., Consigli G.F., Bertorelli G., Pesci A., Barbee R.A., Olivieri D. Bronchial responsiveness to distilled water and methacholine and its relationship to inflammation and remodeling of the airways in asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996. Vol.153, № 3. P.910-917.

141. Cho Y.S., Moon H.B. The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma // *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2010. Vol. 2, № 3. P. 183-187.
142. Christoph K., Beck F.X., Neuhofer W. Osmoadaptation of mammalian cells – an orchestrated network of protective genes // *Curr. Genomics.* 2007. Vol. 8, № 4. P. 209–218.
143. Chrousos G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation // *N. Engl. J. Med.* 1995. Vol. 332, № 20. P. 1351-1362.
144. Ciura S., Bourque C.W. Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26, № 35. P. 9069-9075.
145. Colbert H.A., Smith T.L., Bargmann C.I. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans* // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17, № 21. P. 8259–8269.
146. Corradi M., Rubinstein I., Andreoli R., Manini P., Caglieri A., Poli D., Alinovi R., Mutti A. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003. Vol. 167, № 10. P. 1380–1386.
147. Cracowski J.L., Cracowski C., Bessard G., Pepin J.L., Bessard J., Schwebel C., Stanke-Labesque F., Pison C. Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001. Vol. 164, № 6. P. 1038-1042.
148. Dasgupta S., Hohman T.C., Carper D. Hypertonic stress induces alpha B-crystallin expression // *Exp. Eye Res.* 1992. Vol. 54, № 3. P. 461-470.
149. 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.
150. Deering-Rice C.E., Stockmann C., Romero E.G., Lu Z., Shapiro D., Stone B.L., Fassel B., Nkoy F., Uchida D.A., Ward R.M., Veranth J.M., Reilly C.A. Characterization of transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) variant activation by coal fly ash particles and associations with altered TRPA1 expression and asthma // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 48. P.

- 24866-24879.
151. Delescluse I., Mace H., Adcock J.J. Inhibition of airway hyper-responsiveness by TRPV1 antagonists (SB-705498 and PF-04065463) in the unanaesthetized, ovalbumin-sensitized guinea pig // *Br. J. Pharmacol.* 2012. Vol. 166, № 6. P. 1822-1832.
152. Del Giacco S.R., Firinu D., Bjermer L., Carlsen K.H. Exercise and asthma: an overview // *Eur. Clin. Respir. J.* 2015. Vol. 2: 27984.
153. 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.
154. Dhaka A., Uzzell V., Dubin A.E., Mathur J., Petrus M., Michael M., Pata-poutian A. TRPV1 is activated by both acidic and basic pH // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29, № 1. P. 153–158.
155. Dienz O., Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses // *Clin. Immunol.* 2009. Vol. 130, № 1. P. 27-33.
156. Dietrich A., Chubanov V., Kalwa H., Rost B.R., Gudermann T. Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells // *Pharmacol. Ther.* 2006. Vol. 112, № 3. P. 744-760.
157. Djukanovic R., Sterk P.J., Fahy J.V., Hargreave F.E. Standardised methodology of sputum induction and processing // *Eur. Respir. J.* 2002. Vol. 20, № 37(suppl.). P.1S–52S.
158. Dmitrieva N., Kultz D., Michea L., Ferraris J., Burg M. Protection of renal inner medullary epithelial cells from apoptosis by hypertonic stress-induced p53 activation // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 24. P. 18243-18247.
159. Doelman C.J., Bast A. Oxygen radicals in lung pathology // *Free Radic. Biol. Med.* 1990. Vol. 9, № 5. P. 381–400
160. Duan D.M., Wu S., Hsu L.A., Teng M.S., Lin J.F., Sun Y.C., Cheng C.F., Ko Y.L. Associations between TRPV4 genotypes and body mass index in Taiwanese subjects // *Mol. Genet. Genomics.* 2015. Vol. 290, № 4. P. 1357-1365.
161. Duong M., Subbarao P., Adelroth E., Obminski G., Strinich T., Inman M.,

- Pedersen S., O'Byrne P.M. Sputum eosinophils and the response of exercise-induced bronchoconstriction to corticosteroid in asthma // *Chest*. 2008. Vol. 133, № 2. P. 404–411.
162. Dweik R.A., Amann A. Exhaled breath analysis: the new frontier in medical testing // *J. Breath Res.* 2008. Vol. 2, №3: 030301.
163. Dworski R. Oxidant stress in asthma // *Thorax*. 2000. Vol. 55, Suppl. 2. P. S51-S53.
164. Effros R.M., Hoagland K.W., Bosbous M., Castillo D., Foss B., Dunning M., Gare M., Lin W., Sun F. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. Vol. 165, № 5. P. 663-669.
165. 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.
166. Fabbri L.M., Mapp C.E., Hendrick D.J. Comparison of ultrasonically nebulized distilled water and hyperventilation with cold air in asthma // *Ann. Allergy*. 1984. Vol. 53, № 2. P. 172-177.
167. Fedan J.S., Yuan L.X., Chang V.C., Viola J.O., Cutler D., Pettit L.L. Osmotic regulation of airway reactivity by epithelium // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999. Vol. 289, № 2. P. 901-910.
168. Fehniger T.A., Shah M.H., Turner M.J., VanDeusen J.B., Whitman S.P., Cooper M.A., Suzuki K., Wechser M., Goodsaid F., Caligiuri M.A. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response // *J. Immunol.* 1999. Vol. 162, № 8. P. 4511-4520.
169. Fernández-Fernández J.M., Andrade Y.N., Arniges M., Fernandes J., Plata C., Rubio-Moscardo F., Vázquez E., Valverde M.A. Functional coupling of TRPV4 cationic channel and large conductance, calcium-dependent potassium channel in human bronchial epithelial cell lines // *Pflugers Arch.* 2008. Vol. 457, № 1. P. 149-159.
170. Ferraris J.D., Williams C.K., Persaud P., Zhang Z., Chen Y., Burg M.B. Activity of the TonEBP/OREBP transactivation domain varies directly with extracellular NaCl concentration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002.

- Vol. 99, № 2. P. 739-744.
171. Fickenscher H., Hör S., Küpers H., Knappe A., Wittmann S., Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines // *Trends Immunol.* 2002. Vol. 23, № 2. P. 89-96.
172. 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. Vol. 138, № 3. P. 685-688.
173. Fogarty A., Britton J. The role of diet in the etiology of asthma // *Clin. Exp. Allergy.* 2000. Vol. 30, № 5. P. 615-627.
174. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. Vol. 226, № 1. P. 497-509.
175. Forman H.J., Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling // *Am. J. Respir. Grit. Care Med.* 2002. Vol. 166, suppl. 1. P.S4-S8.
176. Forsberg L., de Faire U., Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease // *Arch. Biochem. Biophys.* 2001. Vol. 389, № 1. P. 84-93.
177. Freinbichler W., Colivicchi M.A., Stefanini C., Bianchi L., Ballini C., Misini B., Weinberger P., Linert W., Varešlija D., Tipton K.F., Della Corte L. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. Vol. 68, № 12. P. 2067-2079.
178. Fu M., Zhu X., Zhang J., Liang J., Lin Y., Zhao L., Ehrenguber M.U., Chen Y.E. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis // *Gene.* 2003. Vol. 315. P. 33-41.
179. Fujisawa T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2005. Vol. 4, № 4. P. 505-509.
180. Fulkerson P.C., Fischetti C.A., Rothenberg M.E. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling // *Am. J. Pathol.* 2006. Vol. 169, № 6. P. 2117-2126.
181. Fürst J., Gschwentner M., Ritter M., Bottà G., Jakab M., Mayer M., Garavaglia L., Bazzini C., Rodighiero S., Meyer G., Eichmüller S., Wöll E., Paulmichl M. Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells // *Pflugers Arch.*

2002. Vol. 444, № 1-2. P. 1-25.
182. Gajdocsi R., Bikov A., Antus B., Horvath I., Barnes P.J., Kharitonov S.A. Assessment of reproducibility of exhaled hydrogen peroxide concentration and the effect of breathing pattern in healthy subjects // *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 2011. Vol. 24, № 6. P. 271–275.
183. Gandhapudi S.K., Tan C., Marino J.H., Taylor A.A., Pack C.C., Gaikwad J., Van De Wiele C.J., Wren J.D., Teague T.K. IL-18 acts in synergy with IL-7 to promote ex vivo expansion of T lymphoid progenitor cells // *J. Immunol.* 2015. Vol. 194, № 8. P. 3820-3828.
184. Georas S.N., Gue J., De Fanis U., Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease // *Eur. Respir. J.* 2005. Vol. 26, № 6. P. 1119-1137.
185. Gessner C., Kuhn H., Seyfarth H.J., Pankau H., Winkler J., Schauer J., Wirtz H. Factors influencing breath condensate volume // *Pneumologie.* 2001. Vol. 55, № 9. P. 414–419.
186. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Updated 2016). URL: <http://www.ginasthma.com>.
187. Go W.Y., Liu X., Roti M.A., Liu F., Ho S.N. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101, № 29. P. 10673-10678.
188. Gomis A., Soriano S., Belmonte C., Viana F. Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels // *J. Physiol.* 2008. Vol. 586, № 23. P. 5633-5649.
189. Gotshal R.W. Exercise-induced bronchoconstriction // *Drugs.* 2002. Vol. 62, № 12. P. 1725-1739.
190. Grace M., Birrell M.A., Dubuis E., Maher S.A., Belvisi M.G. Transient receptor potential channels mediate the tussive response to prostaglandin E2 and bradykinin // *Thorax.* 2012. Vol. 67, № 10. P. 891-900.
191. Green R.H., Brightling C.E., McKenna S., Hargadon B., Parker D., Bradding P., Wardlaw A.J., Pavord I.D. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial // *Lancet.* 2002. Vol. 360, № 9347. P. 1715–1721.
192. Grimm C., Kraft R., Sauerbruch S., Schultz G., Harteneck C. Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3 // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 21493-21501.
193. Groneberg D.A., Niimi A., Dinh Q.T., Cosio B., Hew M., Fischer A.,

- Chung K.F. In-creased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004. Vol. 170, № 12. P. 1276-1280.
194. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing 1999. American Thoracic Society // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. Vol. 161, № 1. P. 309-329.
195. Hallstrand T.S. New insights into pathogenesis of exercise-induced bronchoconstriction // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2012. Vol. 12, № 1. P. 42-48.
196. Hamanaka K., Jian M.Y., Townsley M.I., King J.A., Liedtke W., Weber D.S., Eyal F.G., Clapp M.M., Parker J.C. TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2010. Vol. 299, № 3. P.L353-L362.
197. Hammelmann E., Gelfand E.W. IL-5–induced airway eosinophilia the key to asthma? // *Immunol. Rev.* 2001. Vol. 179. P. 182–191.
198. Heiner I., Eisfeld J., Lückhoff A. Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes // *Cell Calcium.* 2003. Vol. 33, № 5-6. P. 533-540.
199. Hogan S.P., Rosenberg H.F., Moqbel R., Phipps S., Foster P.S., Lacy P., Kay A.B., Rothenberg M.E. Eosinophils: biological properties and role in health and disease // *Clin. Exp. Allergy.* 2008. Vol. 38, № 5. P. 709–750.
200. Horváth I., Hunt J., Barnes P.J. et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions // *Eur. Respir. J.* 2005. Vol. 26, № 3. P. 523-548.
201. Hoshino T., Wiltrout R.H., Young H.A. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response // *J. Immunol.* 1999. Vol. 162, № 9. P. 5070-5077.
202. Hwang S.W., Cho H., Kwak J., Lee S.Y., Kang C.J., Jung J., Cho S., Min K.H., Suh Y.G., Kim D., Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97, № 11. P.6155-6160.
203. Ignatowska-Jankowska B., Jankowski M., Glac W., Swiergel A.H. Cannabidiol-induced lymphopenia does not involve NKT and NK cells // *J. Physiol. Pharmacol.* 2009. Vol. 60, Suppl. 3. P. 99-103.
204. Jia Y., Wang X., Varty L., Rizzo C.A., Yang R., Correll C.C., Phelps P.T., Egan R.W., Hey J.A. Functional TRPV4 channels are expressed in human

- airway smooth muscle cells // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004. Vol. 287, № 2. P. L272-L278.
205. Jin Y.S., Park K.K., Park J.Y., Kim M.J., Lee W.L., Kim H.Y., Lee H.J., Park E.K. Effects of exercise-induced oxidative stress and antioxidant supplementation on NF- κ B activation in peripheral mononuclear cells // *Korean J. Sports Med.* 2000. Vol. 18, № 2. P. 261–270.
206. Kawai Y., Kiyokawa H., Kimura Y., Kato Y., Tsuchiya K., Terao J. Hypochlorous acid-derived modification of phospholipids: characterization of aminophospholipids as regulatory molecules for lipid peroxidation // *Biochemistry.* 2006. Vol. 45, № 47. P. 14201-14211.
207. Kay A.B., Phipps S., Robinson D.S. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma // *Trends Immunol.* 2004. Vol. 25, № 9. P. 477-482.
208. Kelly F.J. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects // *Occup. Environ. Med.* 2003. Vol. 60, № 8. P. 612-618.
209. Kharitonov S.A., Barnes P.J. Exhaled markers of pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001. Vol. 183, № 7. P. 1693-1722.
210. Kim R.S., LaBella F.S. Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation profiles of authentic lipids // *J. Lipid Res.* 1987. Vol. 28, № 9. P. 1110-1117.
211. Kinnula V.L., Crapo J.D. Superoxide dismutase's in the lung and human lung diseases // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003. Vol. 167, № 12. P. 1600-1619.
212. Kino T., Takatori H., Manoli I., Wang Y., Tiulpakov A., Blackman M.R., Su Y.A., Chrousos G.P., DeCherney A.H., Segars J.H. Brx mediates the response of lymphocytes to osmotic stress through the activation of NFAT5 // *Sci. Signal.* 2009. Vol. 2, № 57: ra5.
213. Kirkham P.A., Caramori G., Casolari P., Papi A.A., Edwards M., Shamji B., Triantaphyllopoulos K., Hussain F., Pinart M., Khan Y., Heinemann L., Stevens L., Yeadon M., Barnes P.J., Chung K.F., Adcock I.M. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011. Vol. 184, № 7. P. 796-802.
214. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe // *J. Leukos. Biol.* 2005. Vol. 77, № 5. P. 598-625.
215. Kojima R., Randall J., Brenner B.M., Gullans S.R. Osmotic stress protein

- 94 (Osp94). A new member of the Hsp110/SSE gene subfamily // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, № 21. P. 12327-12332.
216. Kollarik M., Udem B.J. Activation of bronchopulmonary vagal afferent nerves with bradykinin, acid and vanilloid receptor agonists in wild-type and TRPV1^{-/-} mice // *J. Physiol.* 2004. Vol. 555, Pt. 1. P. 115-123.
217. Konstantinidi E.M., Lappas A.S., Tzortzi A.S., Behrakis P.K. Exhaled breath condensate: technical and diagnostic aspects // *The Scientific World Journal.* 2015; 2015: 435160.
218. Kotaru C., Coreno A., Skowronski M., Muswick G., Gilkeson R.C., McFadden E.R. Jr. Morphometric changes after thermal and methacholine bronchoprovocations // *J. Appl. Physiol.* 2005. Vol. 98, № 3. P. 1028-1036.
219. Kowase T., Nakazato Y., Yoko-O H., Morikawa A., Kojima I. Immunohistochemical localization of growth factor-regulated channel (GRC) in human tissues // *Endocr. J.* 2002. Vol. 49, № 3. P. 349-355.
220. Küper C., Steinert D., Fraek M.L., Beck F.X., Neuhofer W. EGF receptor signaling is involved in expression of osmoprotective TonEBP target gene aldose reductase under hypertonic conditions // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009. Vol. 296, № 5. P. F1100-F1108.
221. Lacy P., Moqbel R. Eosinophil cytokines // *Chem. Immunol.* 2000. Vol. 76. P. 134–155.
222. Lacy P., Abdel-Latif D., Steward M., Musat-Marcu S., Man S.F., Moqbel R. Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects // *J. Immunol.* 2003. Vol. 170, № 5. P. 2670-2679.
223. Larsson K., Tornling G., Gavhed D., Müller-Suur C., Palmberg . Inhalation of cold air increases the number of inflammatory cells in the lungs in healthy subjects // *Eur. Respir. J.* 1998. Vol. 12, № 4. P. 825-830.
224. Lembrechts R., Brouns I., Schnorbusch K., Pintelon I., Timmermans J.-P., Adriaensen D. Functional expression of the hypo-osmosensitive channels TRPV4 and TRPM3 in mouse airway epithelium // *FASEB J.* 2010. Vol. 24, № 1. Suppl. 612.9.
225. Leuppi J.D., Salome C.M., Jenkins C.R., Koskela H., Brannan J.D., Anderson S.D., Andersson M., Chan H.K., Woolcock A.J. Markers of airway inflammation and airway hyperresponsiveness in patients with well-controlled asthma // *Eur. Respir. J.* 2001. Vol. 18, № 3. P. 444–450.

226. Leuppi J.D., Anderson S.D., Brannan J.D., Belousova E., Reddel H.K., Rodwell L.T. Questionnaire responses that predict airway response to hypertonic saline // *Respiration*. 2005. Vol. 72, № 1. P. 52-60.
227. Li N., Xia T., Nel A.E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 44, № 9. P. 1689-1699.
228. Liedtke W., Choe Y., Marti-Renom M.A., Bell A.M., Denis C.S., Sali A., Hudspeth A.J., Friedman J.M., Heller S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor // *Cell*. 2000. Vol. 103, № 3. P. 525–535.
229. Liedtke W., Friedman J.M. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. Vol. 100, № 23. P. 13698-13703.
230. Lim W.C., Park M., Bahn J.J., Inoue H., Lee Y.J. Hypertonic sodium chloride induction of cyclooxygenase-2 occurs independently of NF-kappaB and is inhibited by the glucocorticoid receptor in A549 cells // *FEBS Lett.* 2005. Vol. 579. P. 5430–5436.
231. Lin R.L., Hayes D., Lee L.Y. Bronchoconstriction induced by hyperventilation with humidified hot air: role of TRPV1-expressing airway afferents // *J. Appl. Physiol.* 2009. Vol.106, № 6. P. 1917-1924.
232. Link T.M., Park U., Vonakis B.M., Raben D.M., Soloski M.J., Caterina M.J. TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis // *Nat. Immunol.* 2010. Vol. 11, № 3. P. 232-239.
233. López-Rodríguez C., Aramburu J., Jin L., Rakeman A.S., Michino M., Rao A. Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress // *Immunity*. 2001. Vol. 15, № 1. P. 47-58.
234. Lorenzo I.M., Liedtke W., Sanderson M.J., Valverde M.A. TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. Vol. 105, № 34. P. 12611-12616.
235. Lundbäck B., Rönmark E., Lindberg A., Jonsson A.C., Larsson L.G., Pétaavy F., James M. Control of mild to moderate asthma over 1-year with the combination of salmeterol and fluticasone propionate // *Respir. Med.* 2006. Vol. 100, № 1. P. 2-10.

236. Luster A.D., Tager A.M. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way // *Nat. Rev. Immunol.* 2004. Vol. 4, № 9. P. 711–724.
237. Mak S.K., Kültz D. Gadd45 proteins induce G2/M arrest and modulate apoptosis in kidney cells exposed to hyperosmotic stress // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 37. P. 39075-39084.
238. MacNee W.D. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease // *Proceedings of the ATS.* 2005. Vol. 1, № 2. P. 50-60.
239. Malle E., Marsche G., Arnhold J., Davies M.J. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. Vol. 1761, № 4. P. 392-415.
240. Maltseva T.A., Pirogov A.B., Kolosov V.P., Ushakova E.V., Naryshkina S.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: P2022.
241. Maniscalco M., Vatrella A., Pelaia G., Ricciardolo F.L., Sofia M. Inhaled ultrasonically nebulized distilled water decreases exhaled nitric oxide in asthma // *Lung.* 2002. Vol. 180, № 6. P. 319-326.
242. Marek E., Mückenhoff K., Streckert H.J., Becher G., Marek W. Measurements of L-lactate and H₂O₂ in exhaled breath condensate at rest and mild to moderate exercise in young and healthy subjects // *Pneumologie.* 2008. Vol. 62, № 9. P. 541-547.
243. Marek E., Platen P., Volke J., Mückenhoff K., Marek W. Hydrogen peroxide release and acid-base status in exhaled breath condensate at rest and after maximal exercise in young, healthy subjects // *Eur. J. Med. Res.* 2009. Vol. 14 (Suppl. IV). P. 134-139.
244. Martin G., O'Connell R.J., Pietrzykowski A.Z., Treistman S.N., Ethier M.F., Madison J.M. Interleukin-4 activates large-conductance, calcium-activated potassium (BKCa) channels in human airway smooth muscle cells // *Exp. Physiol.* 2008. Vol. 93, № 7. P. 908-918.
245. Martin L.D., Krunkosky T.M., Voynow J.A., Adler K.B. The role of reactive oxygen and nitrogen species in airway epithelial gene expression // *Environ Health Perspect.* 1998. Vol. 106, Suppl. 5. P. 1197-1203.
246. McAlexander M.A., Luttmann M.A., Hunsberger G.E., Udem B.J. Transient receptor potential vanilloid 4 activation constricts the human bronchus

- via the release of cysteinyl leukotrienes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2014. Vol. 349, № 1. P. 118-125.
247. McCafferty J.B., Bradshaw T.A., Tate S., Greening A.P., Innes J.A. Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations // *Thorax.* 2004. Vol. 59, № 8. P. 694–698.
248. McFadden E.R., Lenner K.A.M., Strohl K.P. Postexertional airway rewarming and thermally induced asthma. New insights into pathophysiology and possible pathogenesis // *J. Clin. Invest.* 1986. Vol. 78, № 1. P. 18-25.
249. McGarvey L.P., Butler C.A., Stokesberry S., Polley L., McQuaid S., Abdullah H., Ashraf S., McGahon M.K., Curtis T.M., Arron J., Choy D., Warke T.J., Bradding P., Ennis M., Zholos A., Costello R.W., Heaney L.G. Increased expression of bronchial epithelial transient receptor potential vanilloid 1 channels in patients with severe asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. Vol. 133, № 3. P. 704-712.
250. Miller G. E., Chen E. Life stress and diminished expression of genes encoding glucocorticoid receptor and beta2-adrenergic receptor in children with asthma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103, № 14. P. 5496-5501.
251. Miyakawa H., Woo S.K., Dahl S.C., Handler J.S., Kwon H.M. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96, № 5. P. 2538-2542.
252. Mizuno A., Matsumoto N., Imai M., Suzuki M. Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4 // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003. Vol. 285, № 1. P. C96-C101.
253. Mochizuki H., Ohki Y., Arakawa H., Tokuyama K., Morikawa A. Effect of ultrasonically nebulized distilled water on airway epithelial cell swelling in guinea pigs // *J. Appl. Physiol.* 1999. Vol. 86, № 5. P. 1505-1512.
254. Mochizuki H., Ohki Y., Arakawa H., Kato M., Tokuyama K., Morikawa A. Effect of inhaled indomethacin on distilled water-induced airway epithelial cell swelling // *J. Appl. Physiol.* 2002. Vol. 92, № 1. P.155-161.
255. Mohamed N.R., Granny E.A.A., Othman K.M. Analysis of induced sputum in patients with bronchial asthma // *Egypt. J. Chest. Dist. Tub.* 2014. Vol. 63, №.1. P. 21–27.

256. Montuschi P., Kharitonov S.A., Ciabattini G., Barnes P.J. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD // *Thorax*. 2003. Vol. 58, № 7. P. 585-588.
257. Montuschi P., Barnes P.J., Roberts L.J. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress // *Faseb J*. 2004. Vol. 18, № 15. P. 791-800.
258. Muraki K., Iwata Y., Katanosaka Y., Ito T., Ohya S., Shigekawa M., Imaizumi Y. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myo-cytes // *Circ. Res*. 2003. Vol. 93, № 9. P. 829-838.
259. Mutlu G.M., Garey K.W., Robbins R.A., Danziger L.H., Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2001. Vol. 164, № 5. P. 731-737.
260. Nair P. What is an «eosinophilic phenotype» of asthma? // *J. Allergy Clin. Immunol*. 2013. Vol. 132, №1. P. 81–83.
261. Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001. Vol. 12, № 1. P. 53-72.
262. Natarajan K., Gottipati K.R., Berhane K., Samten B., Pendurthi U., Boggaram V. Proteases and oxidant stress control organic dust induction of inflammatory gene expression in lung epithelial cells // *Respir. Res*. 2016. Vol. 17, № 1: 137.
263. Naumov D.E., Perelman J.M., Kolosov V.P., Prikhodko A.G., Maksimov V.N. The role of TRP4 gene polymorphisms in determining the osmotic airway response in patients with asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2015. Vol. 119: A3529.
264. 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. Vol. 20, № 8. P. 1192-1197.
265. Neuhofer W., Beck F.X. Cell survival in the hostile environment of the renal medulla // *Annu. Rev. Physiol*. 2005. Vol. 67. P. 531-555.
266. Neuhofer W., Fraek M.L., Ouyang N., Beck F.X. Differential expression of heat shock protein 27 and 70 in renal papillary collecting duct and interstitial cells - implications for urea resistance // *J. Physiol*. 2005. Vol. 564, Pt.

3. P. 715-722.
267. Neveu W.A., Allard J.L., Raymond D.M., Bourassa L.M., Burns S.M., Bunn J.Y., Irvin C.G., Kaminsky D.A., Rincon M. Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function // *Respir. Res.* 2010. Vol. 11: 28.
268. Ng T.P., Niti M., Yap K.B., Tan W.C. Dietary and supplemental antioxidant and anti-inflammatory nutrient intakes and pulmonary function // *Public Health Nutr.* 2014. Vol. 17, № 9. P. 2081-2086.
269. Nijenhuis T., Hoenderop J.G., Nilius B., Bindels R.J. (Patho)physiological implications of the novel epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 // *Pflugers Arch.* 2003. Vol. 446. P. 401–409.
270. Nilius B., Voets T. Trp channels: a TR(IP) through a world of multifunctional cation channels // *Pflügers Arch.* 2005. Vol. 451. P. 1–10.
271. Nishihara E., Hiyama T.Y., Noda M. Osmosensitivity of transient receptor potential vanilloid 1 is synergistically enhanced by distinct activating stimuli such as temperature and protons // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 7:e22246.
272. Numata T., Shimizu T., Okada Y. TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. Vol. 292, № 1. P. C460-C467.
273. Ogura T., Ueda H., Hosohara K., Tsuji R., Nagata Y., Kashiwamura S., Okamura H. Interleukin-18 stimulates hematopoietic cytokine and growth factor formation and augments circulating granulocytes in mice // *Blood.* 2001. Vol. 98, № 7. P. 2101-2107.
274. Okamura H., Kashiwamura S., Tsutsui H., Yoshimoto T., Nakanishi K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18 // *Curr. Opin. Immunol.* 1998. Vol.10, №3. P. 259-264.
275. Owsianik G., D'hoedt D., Voets T., Nilius B. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2006. Vol. 156. P. 61-90.
276. Parsons J.P., Hallstrand T.S., Mastrorarde J. G., Kaminsky D.A., Rundell K.W., Hull J.H., Storms W.W., Weiler J.M., Cheek F.M., Wilson K.C., Anderson S.D. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: Exercise-induced bronchoconstriction// *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013. Vol. 187, №9. P. 1016–1027.

277. Parsons J.P., Mastronarde J.G. Exercise induced bronchoconstriction in athletes // *Chest*. 2005. Vol. 128. P. 3966–3974.
278. Pattison D.I., Davies M.J. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases // *Cur. Med. Chem*. 2006. Vol. 13, № 27. P. 3271-3290
279. Pellegrino R., Dellaca R., Macklem P.T., Aliverti A., Bertini S., Lotti P., Agostoni P., Locatelli A., Brusasco V. Effects of rapid saline infusion on lung mechanics and airway responsiveness in humans // *Appl. Physiol*. 2003. Vol. 95, № 2. P.728-734.
280. Perelman J.M., Prikhodko A.G., Fedoseyeva N.M., Kolosov V.P. Role of oxidative stress in cold airway hyperresponsiveness forming // *Eur. Respir. J*. 2009. Vol. 34, Suppl. 53: P712.
281. Perelman J.M., Goryachkina N.M., Prikhodko A.G., Borodin E.A. Dynamics of oxidative stress parameters in exhaled breath condensate at controller treatment of bronchial asthma in patients with cold airway hyperresponsiveness // *Eur. Respir. J*. 2011. Vol. 38, Suppl. 55: P3264.
282. Perelman J.M., Pirogov A.B., Kolosov V.P., Zhou X., Li Q., Ushakova E.V., Maltseva T.A. Cellular composition and cytokine profile of the inflammatory reaction in the patients with bronchial asthma with hypersensitivity to cold trigger // *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 2014. Vol. 189: A4176.
283. Perelman J.M., Pirogov A.B., Prikhodko A.G., Zinoviev S.V., Kolosov V.P., Maltseva T.A. Myeloperoxidase of bronchial leucocytes as a biomarker of osmotic bronchial hyperresponsiveness in asthmatics // *Eur. Respir. J*. 2015. Vol. 46, Suppl. 59: PA3872.
284. Piotrowska T., Siergiejkó G., Siergiejkó Z. Comparison of sensitivity and specificity of two bronchial provocation tests with methacholine and hypertonic saline in bronchial hyperreactivity evaluation in asthmatics // *Pol. Merkur. Lekarski*. 2007. Vol. 22, № 128. P. 126-129.
285. Pizarri T.E., Coleridge H.M., Coleridge J.C. Reflex bronchial vasodilation in dogs evoked by injection of a small volume of water into a bronchus // *J. Appl. Physiol*. 1993. Vol. 75, № 5. P. 2195-2202.
286. Planells-Cases R, Garcia-Sanz N., Morenilla-Palao C., Ferrer-Montiel A. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia // *Pflugers Arch*. 2005.

- Vol. 451, № 1. P. 151-159.
287. Pohl W.R. The pathobiology of COPD // *Wien. Med. Wochenschr.* 2005. Vol. 155. P. 85-89.
288. Powers S.K., Ji L.L., Kavazis A.N., Jackson M.J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle // *Compr. Physiol.* 2011. Vol. 1, № 2. P. 941–969.
289. Priftis K.N., Papadimitriou A., Nicolaidou P., Chrousos G.P. Dysregulation of the stress response in asthmatic children // *Allergy.* 2009. Vol. 64, № 1. P. 18-31.
290. Priftis K.N., Papadimitriou A., Anthracopoulos M.B., Fretzayas A., Chrousos G.P. Endocrine-immune interactions in adrenal function of asthmatic children on inhaled corticosteroids // *Neuroimmunomodulation.* 2009. Vol. 16, № 5. P. 333-339.
291. Psarras S., Caramori G., Contoli M., Papadopoulos N., Papi A. Oxidants in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) // *Curr. Pharm. Des.* 2005. Vol. 11, № 16. P. 2053-2062.
292. Puren A.J., Fantuzzi G., Gu Y., Su M.S., Dinarello C.A. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14 $^{+}$ human blood mononuclear cells // *J. Clin. Invest.* 1998. Vol. 101, № 3. P. 711–721.
293. 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: 2.
294. Rada B., Boudreau H.E., Park J.J., Leto T.L. Histamine stimulates hydrogen peroxide production by bronchial epithelial cells via histamine H1 receptor and dual oxidase // *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 2014. Vol. 50, № 1. P. 125-134..
295. Rahaman S.O., Grove L.M., Paruchuri S., Southern B.D., Abraham S., Niese K.A., Scheraga R.G., Ghosh S., Thodeti C.K., Zhang D.X., Moran M.M., Schilling W.P., Tschumperlin D.J., Olman M.A. TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice // *J. Clin. Invest.* 2014. Vol. 124, № 12. P. 5225-5238.
296. Rahman I., Adcock I.M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD // *Eur. Respir. J.* 2006. Vol. 28, № 1. P. 219-242.
297. Rehman R., Bhat Y.A., Panda L., Mabalirajan U. TRPV1 inhibition attenu-

- ates IL-13 mediated asthma features in mice by reducing airway epithelial injury // *Int. Immunopharmacol.* 2013. Vol. 15, № 3. P. 597-605.
298. Reilly C.A., Johansen M.E., Lanza D.L., Lee J., Lim J.O., Yost G.S. Calcium-dependent and independent mechanisms of capsaicin receptor (TRPV1)-mediated cytokine production and cell death in human bronchial epithelial cells // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2005. Vol. 19, № 4. P. 266-275.
299. Rodrigues T., Sieglitz F., Bernardes G.J. Natural product modulators of transient receptor potential (TRP) channels as potential anti-cancer agents // *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45, № 22. P. 6130-6137.
300. Rong W., Hillsley K., Davis J.B., Hicks G., Winchester W.J., Grundy D. Jejunal afferent nerve sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice // *J. Physiol.* 2004. Vol. 560. P. 867–881.
301. Rorke S., Jennison S., Jeffs J.A., Sampson A.P., Arshad H., Holgate S.T. Role of cysteinyl leukotrienes in adenosine 5'-monophosphate induced bronchoconstriction in asthma // *Thorax.* 2002. Vol. 57, № 4. P. 323-327.
302. Rosias P.P., Dompeling E., Hendriks H.J., Heijns J.W., Donckerwolcke R.A., Jöbsis Q. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls // *Pediatr. Allergy Immunol.* 2004. Vol. 15, № 1. P. 4–19.
303. Ruan T., Lin Y.S., Lin K.S., Kou Y.R. Sensory transduction of pulmonary reactive oxygen species by capsaicin-sensitive vagal lung afferent fibers in rats // *J. Physiol.* 2005. Vol. 565, Pt. 2. P. 563-578.
304. Rubini A. Interleukin-6 and lung inflammation: evidence for a causative role in inducing respiratory system resistance increments // *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 2013. Vol. 12, № 5. P. 315-321.
305. Sabnis A.S., Shadid M., Yost G.S., Reilly C.A. Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008. Vol. 39, № 4. P. 466-474.
306. Sackesen C., Ercan H., Dizdar E., Soyer O., Gumus P., Tosun B.N., Büyüktuncer Z., Karabulut E., Besler T., Kalayci O. A comprehensive evaluation of enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. Vol. 122, № 1. P. 78-85.
307. Samivel R., Kim D.W., Son H.R., Rhee Y.H., Kim E.H., Kim J.H., Bae J.S., Chung Y.J., Chung P.S., Raz E., Mo J.H. The role of TRPV1 in the CD4+ T cell-mediated inflammatory response of allergic rhinitis // *Onco-*

- target. 2016. Vol. 7, № 1. P. 148-160.
308. Sannohe S., Adachi T, Hamada K, Honda K, Yamada Y, Saito N, Cui CH, Kayaba H, Ishikawa K, Chihara J. Upregulated response to chemokines in oxidative metabolism of eosinophils in asthma and allergic rhinitis // *Eur. Respir. J.* 2003. Vol. 21, № 6. P. 925-931.
309. Sant'Ambrogio F.B., Sant'Ambrogio G., Anderson J.W. Effect of furosemide on the response of laryngeal receptors to low-chloride solutions // *Eur. Respir. J.* 1993. Vol. 6. P.1151-1155.
310. Saunders C.I., Kunde D.A., Crawford A., Geraghty D.P. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood // *Mol. Immunol.* 2007. Vol. 44, № 6. P. 1429-1435.
311. Schleiss M.B., Holz O., Behnke M., Richter K., Magnussen H., Jörres R.A. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate // *Eur. Respir. J.* 2000. Vol. 16, № 6. P. 1115-1118.
312. Schumacher M.A., Moff I., Sudanagunta S.P., Levine J.D. Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor: loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 2756–2762.
313. Sharif Naeni R., Witty M.F., Séguéla P., Bourque C.W. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction // *Nat. Neurosci.* 2006. Vol. 9, № 1. P. 93-98.
314. Simpson J.L., Scott R., Boyle M.J., Gibson P.G. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum // *Respirology.* 2006. Vol. 11. P. 54–61.
315. Smith C.M., Anderson S.D. A comparison between the airway response to isocapnic hyperventilation and hypertonic saline in subjects with asthma // *Eur. Respir. J.* 1989. Vol. 2. P. 36-43.
316. Smith G.D., Gunthorpe M.J., Kelsell R.E., Hayes P.D., Reilly P., Facer P., Wright J.E., Jerman J.C., Walhin J.P., Ooi L., Egerton J., Charles K.J., Smart D., Randall A.D., Anand P., Davis J.B. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein // *Nature.* 2002. Vol. 418, № 6894. P. 186–190.
317. Sokolov A.V., Ageeva K.V., Pulina M.O., Cherkalina O.S., Samygina V.R., Vlasova I.I., Panasenko O.M., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties

- of each other // *Free Radic. Res.* 2008. Vol. 42, № 11-12. P. 989-998.
318. Srivastava M.D., Srivastava B.I., Brouhard B. Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells // *Immunopharmacology.* 1998. Vol. 40, № 3. P. 179-185.
319. Stokes A.J., Shimoda L.M., Koblan-Huberson M., Adra C.N., Turner H. A TRPV2-PKA signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells // *J. Exp. Med.* 2004. Vol. 200, № 2. P. 137-147.
320. Sugiura H., Ichinose M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases // *Nitric Oxide.* 2011. Vol. 25. P. 138–144.
321. Sumino K., Sugar E.A., Irvin C.G., Kaminsky D.A., Shade D., Wei C.Y., Holbrook J.T., Wise R.A., Castro M., Writing Committee for American Lung Association Asthma Clinical Research Centers. Variability of methacholine bronchoprovocation and the effect of inhaled corticosteroids in mild asthma // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2014. Vol. 112, № 4. P. 354-360.
322. Taylor-Clark T.E., Udem B.J. Transduction mechanisms in airway sensory nerves // *J. Appl. Physiol.* 2006. Vol. 101, № 3. P. 950-959.
323. Taylor-Clark T.E., Udem B.J. Sensing pulmonary oxidative stress by lung vagal afferents // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2011. Vol. 178. № 3. P. 406-413.
324. Tian W., Fu Y., Garcia-Elias A., Fernández-Fernández J.M., Vicente R., Kramer P.L., Klein R.F., Hitzemann R., Orwoll E.S., Wilmot B., McWeeney S., Valverde M.A., Cohen D.M. A loss-of-function nonsynonymous polymorphism in the osmoregulatory TRPV4 gene is associated with human hyponatremia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. Vol. 106, № 33. P. 14034-14039.
325. Tobler M., Ballen C., Healey M., Wilson M., Olsson M. Oxidant trade-offs in immunity: an experimental test in a lizard // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 5: e0126155.
326. Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli // *Neuron.* 1998. Vol. 21, № 3. P. 531–543.
327. Tränkner D., Hahne N., Sugino K., Hoon M.A., Zuker C. Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways

- // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. Vol. 111, № 31. P. 11515-11520.
328. Uchida S., Kwon H.M., Yamauchi A., Preston A.S., Marumo F., Handler J.S. Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89, № 17. P. 8230-8234.
329. Van Hoydonck P.G., Wuyts W.A., Vanaudenaerde B.M., Schouten E.G., Dupont L.J., Temme E.H. Quantitative analysis of 8-isoprostane and hydrogen peroxide in exhaled breath condensate // Eur. Respir. J. 2004. Vol. 23, № 2. P.189–192.
330. Vaughan J., Ngamtrakulpanit L., Pajewski T.N., Turner R., Nguyen T.A., Smith A., Urban P., Hom S., Gaston B., Hunt J. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity // Eur. Respir. J. 2003. Vol. 22, № 6. P. 889–894.
331. Vergnolle N., Cenac N., Altier C., Cellars L., Chapman K., Zamponi G.W., Materazzi S., Nassini R., Liedtke W., Cattaruzza F., Grady E.F., Geppetti P., Bunnett N.W. A role for transient receptor potential vanilloid 4 in tonic-ity-induced neurogenic inflammation // Br. J. Pharmacol. 2010. Vol. 159, № 5. P. 1161-1173.
332. Veronesi B., Oortgiesen M., Carter J.D., Devlin R.B. Particulate matter initiates in-flammatory cytokine release by activation of capsaicin and acid receptors in a human bronchial epithelial cell line // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1999. Vol. 154. P. 106–115.
333. Vianna E.O., Boaventura L.C., Terra-Filho J., Nakama G.Y., Martinez J.A.B., Martin R.J. Morning-to-evening variation in exercise-induced bronchospasm // J. Allergy Clin. Immunol. 2002. Vol. 110, № 2. P. 236-240.
334. Voets T., Nilius B. The pore of TRP channels: trivial or neglected? // Cell Calcium. 2003. Vol. 33. P. 299–302.
335. Vriens J., Watanabe H., Janssens A., Droogmans G., Voets T., Nilius B. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, № 1. P. 396-401.
336. Wagner P.D. The biology of oxygen // Eur. Respir. J. 2008. Vol. 31. P. 887-890.
337. Wang F., He X.Y., Baines K.J., Gunawardhana L.P., Simpson J.L., Li F., Gibson P.G. Different inflammatory phenotypes in adult and children with

- acute asthma // *Eur. Respir. J.* 2011. Vol. 38, № 3. P. 567–574.
338. Wang Q., Bai X., Xu D., Xu D., Li H., Fang J., Zhu H., Fu W., Cai X., Wang J., Jin Z., Wang Q., Xu C., Chang J. TRPV1 UTR-3 polymorphism and susceptibility of childhood asthma of the Han Nationality in Beijing // *Wei Sheng Yan Jiu.* 2009. Vol. 38, № 5. P. 516-521.
339. Wark P.A., Johnston S.L., Moric I., Simpson J.L., Hensley M.J., Gibson P.G. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma // *Eur. Respir. J.* 2002. Vol. 19, № 1. P. 68–75.
340. Watanabe H., Vriens J., Suh S.H., Benham C.D., Droogmans G., Nilius B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 47044–47051.
341. Watanabe H., Vriens J., Prenen J., Droogmans G., Voets T., Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels // *Nature.* 2003. Vol. 424, № 6947. P. 434-438.
342. Weiler J.M., Anderson S.D., Randolph C. et al. Pathogenesis, prevalence, diagnosis, and management of exercise-induced bronchoconstriction: a practice parameter // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2010. Vol. 105, № 6. P. 1–47.
343. Wenzel S. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches // *Nat. Med.* 2012. Vol. 18, № 5. P. 716–725.
344. Wilkie-Grantham R.P., Magon N.J., Harwood D.T., Kettle A.J., Vissers M.C., Winterbourn C.C., Hampton M.B. Myeloperoxidase-dependent lipid peroxidation promotes the oxidative modification of cytosolic proteins in phagocytic neutrophils // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290, № 15. P. 9896-9905.
345. Willette R.N., Bao W., Nerurkar S., Yue T.L., Doe C.P., Stankus G., Turner G.H., Ju H., Thomas H., Fishman C.E., Sulpizio A., Behm D.J., Hoffman S., Lin Z., Lozinskaya I., Casillas L.N., Lin M., Trout R.E., Votta B.J., Thorneloe K., Lashinger E.S., Figueroa D.J., Marquis R., Xu X. Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: Part 2 // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008. Vol. 326, № 2. P. 443-452.
346. Willumsen N.J., Davis C.W., Boucher R.C. Selective response of human

- airway epithelia to luminal but not serosal solution hypertonicity. Possible role for proximal airway epithelia as an osmolality transducer // *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 94, № 2. P. 779-787.
347. Woo S.K., Lee S.D., Na K.Y., Park W.K., Kwon H.M. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity // *Mol. Cell Biol.* 2002. Vol. 22, № 16. P. 5753-5760.
348. Wood L.G., Gibson P.G., Garg M.L. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma // *Eur. Respir. J.* 2003. Vol. 21. P. 177-186.
349. Wood L.G., Baines K.J., 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.
350. Yamamoto Y., Sato Y., Taniguchi K. Distribution of TRPV1- and TRPV2-immunoreactive afferent nerve endings in rat trachea // *J. Anat.* 2007. Vol. 211, № 6. P. 775-783.
351. Yang X.R., Lin M.J., McIntosh L.S., Sham J.S. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006. Vol. 290, № 6. P. L1267-L1276.
352. Yavari A., Javadi M., Mirmiran P., Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants // *Asian J. Sports Med.* 2015. Vol. 6, № 1: e24898.
353. Yu H., Li Q., Kolosov V.P., Perelman J.M., Zhou X. Regulation of particulate matter-induced mucin secretion by transient receptor potential vanilloid 1 receptors // *Inflammation.* 2012. Vol. 35, № 6. P. 1851-1859.
354. Yuan S., Hollinger M., Lachowicz-Scroggins M.E., Kerr S.C., Dunican E.M., Daniel B.M., Ghosh S., Erzurum S.C., Willard B., Hazen S.L., Huang X., Carrington S.D., Oscarson S., Fahy J.V. Oxidation increases mucin polymer cross-links to stiffen airway mucus gels // *Sci. Transl. Med.* 2015. Vol. 7, № 276: 276ra27.
355. Zamuruyev K.O., Aksenov A.A., Pasamontes A., Brown J.F., Pettit D.R., Foutouhi S., Weimer B.C., Schivo M., Kenyon N.J., Delplanque J.P., Davis C.E. Human breath metabolomics using an optimized non-invasive exhaled breath condensate sampler // *J. Breath Res.* 2016. Vol. 11, № 1: 016001.
356. 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. Vol. 277, № 48. P. 46116-46122.
357. Zhang Q., Illing R., Hui C.K., Downey K., Carr D., Stearn M., Alshafi K., Menzies-Gow A., Zhong N., Fan Chung K. Bacteria in sputum of stable severe asthma and increased airway wall thickness // *Respir. Res.* 2012. Vol. 13: 35.
358. Zhang D., Spielmann A., Wang L., Ding G., Huang F., Gu Q., Schwarz W. Mast-cell degranulation induced by physical stimuli involves the activation of transient-receptor-potential channel TRPV2 // *Physiol. Res.* 2012. Vol. 61, № 1. P. 113-124.
359. Zhao L., Sullivan M.N., Chase M., Gonzales A.L., Earley S. Calcineurin/nuclear factor of activated T cells-coupled vanilloid transient receptor potential channel 4 Ca²⁺ sparklets stimulate airway smooth muscle cell proliferation // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2014. Vol. 50, № 6. P. 1064-1075.
360. Zhu G.; ICGN Investigators, Gulsvik A., Bakke P., Ghatta S., Anderson W., Lomas D.A., Silverman E.K., Pillai S.G. Association of TRPV4 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease // *Hum. Mol. Genet.* 2009. Vol. 18, № 11. P. 2053-2062.
361. Zimmerman M.P., Pizarri T.E. Bronchial vasodilation evoked by increased lower airway osmolarity in dogs // *J. Appl. Physiol.* 2000. Vol. 88, № 2. P. 425-432.
362. Zinellu E., Zinellu A., Fois A.G., Carru C., Pirina P. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review // *Respir. Res.* 2016. Vol. 17, № 1: 150.
363. Zuo L., Pannell B.K., Liu Z. Characterization and redox mechanism of asthma in the elderly // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 18. P. 25010-25021.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

- Юлий Михайлович Перельман** доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания
- Денис Евгеньевич Наумов** кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики неспецифических заболеваний легких Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания
- Анна Григорьевна Приходько** доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональных методов исследования дыхательной системы Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания
- Виктор Павлович Колосов** академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания

Перельман Юлий Михайлович
Наумов Денис Евгеньевич
Приходько Анна Григорьевна
Колосов Виктор Павлович

**МЕХАНИЗМЫ И ПРОЯВЛЕНИЯ ОСМОТИЧЕСКОЙ
ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

Научное издание

Дизайн обложки Ю.М. Гофман

Издательство ФГУП «Дальнаука» ДВО РАН
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 77
Отпечатано в типографии «Фабрика рекламы»,
г. Благовещенск, ул. Ленина, 60/3, тел (4162) 342-150,
Формат 64×84/16. Усл. печ. л. 12,44. Тираж 500.
Подписано к печати 29.11.2016.