

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.248:612.833.92[616-001.19+663.634(-032.2)]

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ И ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С ИЗОЛИРОВАННОЙ И СОЧЕТАННОЙ РЕАКЦИЕЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ НА ХОЛОДНЫЙ ВОЗДУХ И ДИСТИЛЛИРОВАННУЮ ВОДУ

А.Г.Приходько¹, Ю.М.Перельман¹, А.Б.Пирогов¹, Е.А.Бородин^{1,2},
Е.В.Ушакова¹, Н.В.Ульянычев¹, А.В.Колосов¹

¹Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАНН, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

²Амурская государственная медицинская академия, 675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95

РЕЗЮМЕ

С целью определения взаимосвязи между гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой (проба изокапнической гипервентиляции холодным воздухом – ИГХВ) и гипоосмолярный (ультразвуковая ингаляция дистиллированной воды – УИДВ) стимулы, нарушением вентиляционной функции легких, характером воспаления в респираторном тракте и иммуно-метаболическим статусом проведено комплексное обследование 122 больных бронхиальной астмой (БА). У всех пациентов исследовалась базовая вентиляционная функция легких и реакция дыхательных путей на холодовой и осмотический стимулы, показатели оксидативного стресса, спектр цитокинов (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN γ) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) и сыворотке крови, уровень кортизола, адренкортикотропного гормона. Изучалось функциональное состояние β_2 -адренорецепторного комплекса дыхательных путей, по уровню прироста 3'5'-циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). С целью поиска фенотипических различий в характере воспаления и особенностей иммуно-метаболического статуса, все больные были разделены на 4 группы: 1 группа (26%) – с гиперреактивностью дыхательных путей на оба стимула (холодовой и осмотический), 2 группа (15%) – с гиперреактивностью только на УИДВ, 3 группа (26%) – только на ИГХВ, 4 группа (33%) – с отсутствием реакции на оба триггера. Обнаружены существенные межгрупповые различия во взаимоотношениях респираторной функции с основными биохимическими показателями. У больных с реакцией на оба стимула найдены максимальные величины базового уровня H₂O₂, и IL-4 в КВВ, а также повышенный уровень IL-6 в сыворотке крови, по

отношению к остальным группам. У этих пациентов определялась тесная связь между TNF α в КВВ и реакцией (Δ ОФВ₁) дыхательных путей на ИГХВ ($r=-0,76$; $p<0,05$), а также гиперреактивностью бронхов и содержанием в сыворотке крови цАМФ ($r=0,70$; $p<0,01$), что свидетельствовало о более тяжёлом течении болезни. У больных 2 группы ОФВ₁ коррелировал с содержанием IL-4 в КВВ ($r=-0,48$; $p<0,01$), а Δ ОФВ₁ после УИДВ зависел от содержания IL-4 ($r=-0,42$; $p<0,05$) в сыворотке крови и IL-4/IFN γ ($r=-0,50$; $p<0,05$). У больных 3 группы преобладал эозинофильно-нейтрофильный тип воспаления в бронхах. Исходный уровень продукции H₂O₂ и индекс окисления вторичных продуктов перекисного окисления липидов в КВВ был связан с реакцией (Δ ОФВ₁) на ИГХВ, соответственно, $r=0,49$ ($p<0,01$) и $r=0,28$ ($p<0,05$). Исходный ОФВ₁ коррелировал с IL-6 ($r=-0,67$; $p<0,001$) и IL-5 ($r=0,84$; $p<0,05$), а Δ ОФВ₁ после ИГХВ – с уровнем IFN γ ($r=0,65$; $p<0,001$) в сыворотке крови. У больных 4 группы преобладал аллергический тип воспаления, найдена связь между исходным ОФВ₁, секрецией IL-4 в КВВ ($r=-0,66$; $p<0,01$), количеством эозинофилов крови ($r=-0,23$; $p<0,05$).

Проведенные исследования показали, что существуют различные молекулярные подтипы воспалительной реакции у больных БА 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.

Ключевые слова: бронхиальная астма, гиперреактивность дыхательных путей, холодный воздух, осмотический стимул, воспаление, оксидативный стресс.

SUMMARY

PHENOTYPIC DIFFERENCES AND
PECULIARITIES OF INFLAMMATION IN
ASTHMATICS WITH ISOLATED AND
COMBINED AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS
TO COLD AIR AND DISTILLED WATER

A.G.Prikhodko¹, J.M.Perelman¹,
A.B.Pirogov¹, E.A.Borodin^{1,2}, E.V.Ushakova¹,
N.V.Ul'yanychev¹, A.V.Koloso¹

¹Far Eastern Scientific Center of Physiology and
Pathology of Respiration of Siberian Branch RAMS,
22 Kalinina Str., Blagoveshchensk,
675000, Russian Federation

²Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str.,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

A complex examination of 122 patients with bronchial asthma (BA) was done to find out the inter-relationship between airway hyperresponsiveness to cold (isocapnic cold air hyperventilation – ICAH) and hyposmolar (ultrasonic nebulized distilled water – UNDW) stimuli, the disturbance of lung function, the character of inflammation in the respiratory tract and immune-metabolic status. All the patients were studied upon the lung function and airway response to cold and osmotic stimuli, the values of oxidative stress, cytokines spectrum (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN γ) in the exhaled breath condensate (EBC) and the blood serum, the level of cortisol and adrenocorticotrophic hormone. The functional state of β_2 -adrenoreceptive complex of airways was studied by the level of 3'5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) increase. To find phenotypic differences in the inflammation and immune-metabolic status features, all the patients were divided into 4 groups: the 1st group (26%) was with airway hyperresponsiveness to both stimuli (cold and osmotic), the 2nd group (15%) was with airway hyperresponsiveness only to UNDW, the 3rd group (26%) only to ICAH, the 4th group (33%) did not have any response to both triggers. Significant differences in the relationship of the respiratory function and main biochemical values were found. In the patients with the response to both stimuli maximal values of the base level of H₂O₂ and IL-4 in EBC as well as the high level of IL-6 in the blood serum were revealed in comparison with other groups. These patients had a close correlation of TNF α in EBC and the airway response (Δ FEV₁) to ICAH ($r=-0.76$; $p<0.05$), as well as of bronchi hyperresponsiveness and the contents of cAMP ($r=0.70$; $p<0.01$) in the blood serum, which proved a more severe clinical course of the disease. In the patients of the second group FEV₁ correlated with IL4 contents in EBC ($r=-0.48$; $p<0.01$), and Δ FEV₁ after UNDW depended on the contents of IL-4 ($r=-0.42$; $p<0.05$) in the blood serum and IL-4/IFN γ ($r=-0.50$; $p<0.05$). In the patients of the 3rd group eosinophilic-neutrophilic type of bronchi inflammation dominated. The initial level of H₂O₂ production and secondary products oxidation index in EBC was connected with the response of FEV₁ to ICAH ($r=-0.49$, $p<0.01$

and $r=0.28$, $p<0.05$, respectively). The initial FEV₁ correlated with IL-6 ($r=-0.67$; $p<0.001$) and IL-5 ($r=0.84$; $p<0.05$), and Δ FEV₁ after ICAH with the level of IFN γ ($r=-0.65$; $p<0.001$) in the blood serum. The allergic type of inflammation dominated in the 4th group, the correlation of FEV₁, secretion of IL-4 in EBC ($r=-0.66$; $p<0.01$) and the quantity of eosinophils in the blood ($r=-0.23$; $p<0.05$) was found.

We suggested there are different molecular subtypes of the inflammation reaction in the asthmatics with cold and osmotic airway hyperresponsiveness. They have potential clinical importance and open new possibilities in understanding the mechanisms responsible for the formation of bronchoobstructive syndrome and the prospects of its correction.

Key words: asthma, airway hyperresponsiveness, cold air, osmotic stimulus, inflammation, oxidative stress.

Если механизмы трансдукции холодого стимула в дыхательных путях, опосредуемые холод- и ментол-чувствительными рецепторами TRPM8 [11, 23] и участие последних в формировании холодого гиперреактивности дыхательных путей [1] доказаны, то путь формирования избыточной реакции бронхов на воздействие влажного воздуха, несмотря на широту фармакологической и молекулярной информации, носит предположительный характер. Происходящие в осмолярной рецепции изменения связывают как с чрезмерной активностью осмочувствительных нейронов, так и с механическим набуханием ткани, сопровождающимся нарушением в электрохимическом градиенте. Клинические проявления данного патофизиологического феномена слабо выражены, тогда как его возникновение может существенным образом изменить течение бронхиальной астмы (БА) [4]. Кроме того, специфичность существующих реакций для некоторых пациентов подводит к выводу о существовании отдельных фенотипов, связанных с особенностями воспаления, что требует более тщательного изучения.

Цель исследования заключалась в определении взаимосвязи между гиперреактивностью дыхательных путей на холодого и гипоосмолярный стимулы, нарушением вентиляционной функции легких, характером и уровнем воспаления в респираторном тракте и иммуно-метаболическим статусом больных БА.

Материалы и методы исследования

Нами проведено первичное комплексное обследование 122 больных с диагнозом БА, выставленным в соответствие с Федеральными стандартами и Международными согласительными документами (GINA, 2014). Средний возраст пациентов составил 34,7 \pm 1,3 года, рост – 168,3 \pm 1,2 см, вес – 73,5 \pm 2,3 кг. Протокол исследования был одобрен Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН. Больные знакомы с целью и процедурами исследования, подписывали протокол информированного согласия.

Условия проведения функциональных исследований были соблюдены в соответствии с требованиями совместного пересмотра Американского торакального

общества и Европейского респираторного общества [13]. Критерием отбора пациентов служили отсутствие общих противопоказаний для проведения всех функциональных и лабораторных исследований, тяжёлой сопутствующей патологии других органов и систем, а также полное согласие больного и осознание цели обследования. Испытуемые были хорошо информированы о вынужденном дискомфорте, сопровождающем ингаляционные провокационные тесты. Во избежание влияния циркадных ритмов на результаты исследования все пациенты обследовались в первую половину дня.

Спирометрия выполнялась на аппарате Flowscreen (Erich Jaeger, Германия), обратимость обструкции дыхательных путей определяли посредством повторной спирометрии спустя 15 минут после ингаляции 200 мкг сальбутамола.

Для верификации холодовой гиперреактивности дыхательных путей выполнялась проба изокапнической гипервентиляции холодным воздухом (ИГХВ) в течение 3 минут охлаждённой до -20°C воздушной смесью, содержащей 5% CO_2 . Уровень вентиляции соответствовал 60% должной максимальной вентиляции лёгких. Контрольные исследования вентиляционной функции лёгких выполнялись перед началом холодовой провокации и после неё на 1 и 5 минутах восстановительного периода. Основным критерием оценки служило падение ОФВ_1 более чем на 10% от исходной величины сразу после провокации и более чем на 15% – через 5 минут после нее [3].

С целью определения реакции дыхательных путей к гипоосмолярному стимулу пациентам выполнялась бронхопровокация (ультразвуковая ингаляция) дистиллированной водой (УИДВ). Исследование включало две последовательные УИДВ длительностью 3 минуты каждая. Для первой ингаляции использовали 30 мл стерильного изотонического раствора (0,9%) натрия хлорида, при второй – такое же количество дистиллированной воды. Контрольные исследования вентиляционной функции лёгких выполнялись перед началом бронхопровокации и после неё на 1 и 5 минутах отдыха. Осмотическую гиперреактивность дыхательных путей диагностировали при падении ОФВ_1 более чем на 10% от исходной величины показателя [5].

Сбор конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) выполнялся при помощи аппарата ECoScreen II (Erich Jaeger, Германия), снабжённого клапанной системой, которая позволяла осуществлять вдох из окружающего атмосферы, а выдох – в устройство, конденсирующее пары выдыхаемого воздуха. Исследование проводилось в утренние часы после двукратного ополаскивания ротовой полости дистиллированной водой, в течение 20 минут при спокойном дыхании обследуемого. Пробирки с материалом немедленно помещали в морозильную камеру при температуре -70°C , где они хранились до проведения биохимических исследований.

Содержание пероксида водорода (H_2O_2) в КВВ определяли электрохимическим методом с помощью

биоанализатора БИО 3 (Практик НЦ, Россия), оснащённого биосенсорами на основе берлинской лазури. Диеновые конъюгаты, кетодиены и сопряженные триены в КВВ определяли спектрофотометрически в УФ-области в хлороформной фазе липидного экстракта при помощи спектрофотометра ПЭ-5400 УФ (Россия).

Уровень цитокинов (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN γ) в КВВ и сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на иммуноферментном анализаторе Мультискан (TermoFisherScientific, Финляндия) при помощи реактивов производства фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия), основным реагентом которых являются моноклональные антитела к интерлейкинам, сорбированные на поверхности лунок разборного полистирольного планшета.

Для оценки иммунного и гормонального статуса пациентам выполнялся забор крови из локтевой вены в утренние часы, натощак. Образцы замораживали и хранили при -20°C не более 2 недель. Определение иммунологических показателей проводилась общепринятыми стандартными методиками. Уровень общего IgE оценивали методом ИФА с использованием реактивов «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) согласно инструкции производителя. Для определения уровня адренокортикотропного гормона (АКТГ) твердофазным ИФА использовался набор реактивов Biomerica ATCH ELISA (США). Для определения уровня кортизола в сыворотке крови методом ИФА использовали наборы реактивов АЛКОР БИО (Санкт-Петербург, Россия). Функциональное состояние β_2 -адренорецепторного комплекса дыхательных путей оценивали радиоиммунологическим методом, по уровню прироста 3'5'-циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) после стимуляции адреналином 10^{-6} М, с использованием наборов фирмы «Amersham» (Англия).

Объём проводимого обследования больных определялся поставленными задачами. Дизайн предполагал в первый день обследования последовательно измерение, сбор КВВ и забор крови из вены, проведение пробы ИГХВ, на следующий день – проведение бронхопровокационной пробы УИДВ. Перед всеми исследованиями отменялась медикаментозная терапия, запрещался в течение 1,5 часов приём пищи и горячих напитков, курение, выполнение любой физической нагрузки, изменение местонахождения.

Статистический анализ полученного материала проводился на основе стандартных методов вариационной статистики. Для определения достоверности различий использовали непарный критерий t (Стьюдента), в случаях негауссовых распределений – непараметрические критерии Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни. С целью определения степени связи между двумя случайными величинами проводили корреляционный анализ, рассчитывали коэффициент корреляции (r). Для всех величин принимались во внимание уровни значимости (p) 0,05; 0,01; 0,001.

Результаты исследования

С целью поиска фенотипических различий в харак-

тере воспаления и иммуно-метаболическом статусе, все больные были разделены на 4 группы (рис. 1): 1 группа (26%) – с гиперреактивностью дыхательных путей на оба стимула (холодовой и осмотический); 2 группа (15%) – с высокой чувствительностью бронхов только на УИДВ; 3 группа (26%) – с гиперреактивностью только на ИГХВ; 4 группа (33%) – с отсутствием реакции на оба триггера. Внутригрупповые различия в реакции на бронхопровокационные стимулы представлены на рисунке 1. Исходно больные 1 группы имели достоверно более низкие значения $ОФВ_1$ ($84,0 \pm 2,8\%$) по отношению к больным 2 группы ($93,2 \pm 2,9\%$, $p < 0,05$), 3 группы ($92,8 \pm 2,1\%$, $p < 0,05$) и 4 группы ($99,2 \pm 1,3\%$, $p < 0,001$).

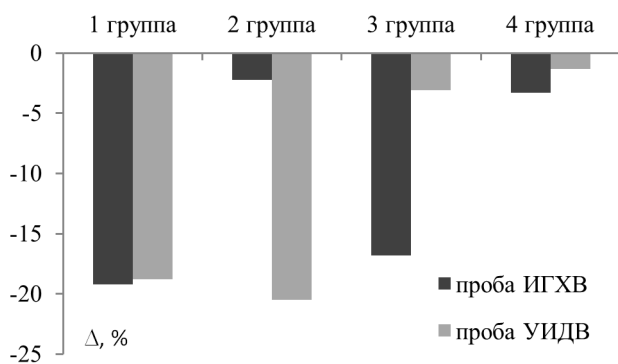


Рис. 1. Внутригрупповые различия в реакции на бронхопровокационные стимулы.

При оценке степени выраженности оксидативного стресса по эндогенной продукции H_2O_2 и продуктам перекисного окисления липидов в КВВ, у пациентов 1 группы были обнаружены максимальные величины базового уровня H_2O_2 (рис. 2), в 1,4 раза превышавшие минимальные значения, полученные у лиц с изолированной реакцией на дистиллированную воду, в сочетании с относительно низким образованием диеновых конъюгатов. Аналогичная тенденция прослеживалась у лиц 3 группы.

Профиль цитокинов в сыворотке крови и КВВ представлен в таблице. Наиболее яркие изменения найдены при исследовании IL-5, концентрация которого в сыворотке крови у больных 1 группы и пациентов с изолированной реакцией к холодному воздуху более чем в 2 раза превышала таковую во 2 и 4 группах. Кроме того, у больных, реагирующих на оба триггера, в обеих биологических средах (сыворотке крови и КВВ) обнаружен максимально высокий уровень продукции противовоспалительного IL-4, регулирующего иммунный ответ, а также повышенный уровень провоспалительного IL-6 в сыворотке крови. Последний, наряду с TNF α и IL-1 β , традиционно рассматривается как биомаркер продолжающегося воспаления, в то же время он может выступать 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 обследуемых группах наблюдалось увеличение уровня общего IgE с макси-

мальными 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.

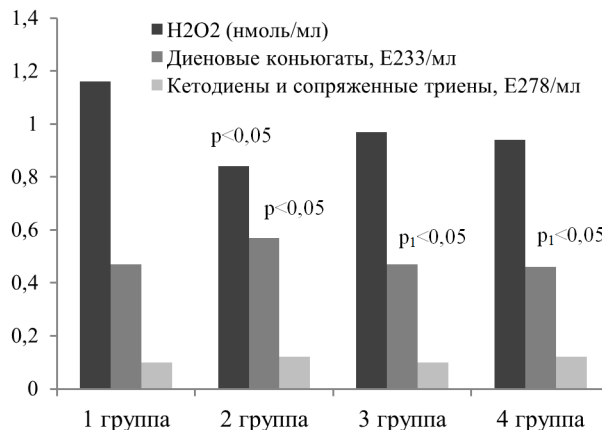


Рис. 2. Сравнительная характеристика показателей оксидативного стресса в конденсате выдыхаемого воздуха.

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с 1 группой; p_1 – достоверность различий в сравнении со 2 группой.

Оценивая гормональный статус больных, мы не нашли достоверных межгрупповых различий при исследовании кортизола ($571,1 \pm 46,7$; $603,3 \pm 38,3$; $598,4 \pm 58,8$; $638,4 \pm 19,6$ нмоль/л в 1-4 группах, соответственно) в сыворотке крови, хотя у пациентов 1 группы прослеживалась явная тенденция к снижению показателя по отношению к 4 группе. Во всех группах отмечалось повышение функциональной активности надпочечников, свидетельствующее об адаптивной реакции на стрессовую ситуацию, в большей степени при легкой течения заболевания. При изучении гипофизарной функции по секреции АКТГ также не было выявлено достоверных различий между группами ($25,3 \pm 2,03$; $21,3 \pm 2,72$; $20,4 \pm 3,27$; $18,3 \pm 4,14$ мг/мл в 1-4 группах, соответственно). При исследовании функционального состояния β_2 -адренорецепторного комплекса дыхательных путей по уровню стимулированного цАМФ, найдены достоверно более низкие его значения у лиц 1 и 3 групп ($58,3 \pm 6,6$ и $64,6 \pm 5,3$ пмоль/ 10^6 клеток, соответственно) относительно пациентов, не имевших реакции на стимулы ($79,9 \pm 2,3$ пмоль/ 10^6 клеток; $p < 0,001$; $p < 0,01$), и некоторое снижение по отношению к больным 2 группы ($69,3 \pm 2,6$ пмоль/ 10^6 клеток; $p > 0,05$).

По данным корреляционного анализа обнаружены тесные взаимоотношения между реактивностью дыхательных путей и проходимость бронхов. Так, исходная проходимость бронхов ($ОФВ_1$, %) существенно влияла на выраженность реакции ($\Delta ОФВ_1$, %), получаемой при провокации и носила линейный характер ($r = 0,39$; $p < 0,05$) в пробе с дистиллированной водой. При пробе ИГХВ данная зависимость была обратной ($r = -0,44$; $p < 0,05$). На общей совокупности больных

прослеживалась чёткая связь между выраженностью реакции дыхательных путей ($\Delta\text{ОФВ}_1$, %) на стимулы (УИДВ и ИГХВ) и базовым уровнем эозинофилов крови ($r=-0,16$; $p<0,05$ и $-0,27$; $p<0,001$, соответ-

ственно), а также изменением ОФВ_1 в ответ на холодовую бронхопровокацию и содержанием IL-5 ($r=-0,34$; $p<0,05$) в плазме крови. Эти связи терялись при оценке каждой группы в отдельности.

Таблица

Уровень некоторых цитокинов и IgE в сыворотке крови и конденсате выдыхаемого воздуха (M±m)

Показатели	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
Сыворотка крови				
IL-4, пг/мл	3,62±0,46	3,08±0,57	2,13±0,51*	3,06±0,45
IL-5, пг/мл	8,89±0,61	4,09±0,53***	9,40±0,57; $p_1<0,001$	3,24±0,54***; $p<0,001$
IL-6, пг/мл	1,80±0,26	1,43±0,27	1,06±0,34	1,52±0,29
IL-8, пг/мл	7,58±0,70	7,84±0,88	10,38±0,91*	5,93±0,97; $p<0,01$
IFN γ , пг/мл	58,8±28,9	56,9±23,4	60,8±20,27	48,4±26,4
TNF α , пг/мл	3,05±0,86	0,85±0,33	0,27±0,18	0,31±0,17**
IgE, МЕ/мл	199,9±46,39	183,3±41,32	176,6±34,38	116,1±18,28*
Конденсат выдыхаемого воздуха				
IL-4, пг/мл	5,1±0,36	3,05±0,46**	3,8±0,32*	4,23±0,42
IL-5, пг/мл	14,5±1,55	14,1±2,59	24,2±3,51*; $p_1<0,01$	11,14±1,33; $p<0,01$
IL-6, пг/мл	1,17±0,33	2,27±0,32*	1,80±0,34	2,32±0,36*
IL-8, пг/мл	0,85±0,33	0,37±0,13	1,80±0,70	0,93±0,41
IFN γ , пг/мл	17,5±3,48	20,53±3,94	16,2±3,30	29,4±3,33*; $p<0,01$
TNF α , пг/мл	0,79±0,25	0,45±0,14	0,44±0,23	0,47±19

Примечание: звёздочкой отмечена достоверность различий показателей с 1 группой (* – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$); p – достоверность различий между 3 и 4 группами; p_1 – достоверность различий с в сравнении со 2 группой.

Нами 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 IL-4: ОФВ_1 коррелировал с содержанием IL-4 в КВВ ($r=-0,48$; $p<0,01$), а степень падения ОФВ_1 в ответ на УИДВ зависела как от концентрации IL-4 в сыворотке крови ($r=-0,42$; $p<0,05$), так и от соотношения IL-4 к IFN γ ($r=-0,50$; $p<0,05$), что подтверждало функциональную активность Th2-лимфоцитов. Характерно, что и у пациентов 4 группы, клинически и функционально более «лёгких», найдена связь между исходным 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 холодной 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 КВВ,

значительно влияли на степень развиваемой реакции после холодной бронхопровокации (соответственно, $r=-0,49$; $p<0,01$ и $r=0,28$; $p<0,05$). 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 γ ($r=-0,65$; $p<0,001$) в сыворотке крови. 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 тоже время, обращает на себя внимание факт влияния одного из самых важных маркеров воспаления – TNF α в КВВ – на выраженность бронхоконстрикторной реакции дыхательных путей после холодной 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.

Обсуждение результатов исследования

БА – многофакторное и гетерогенное заболевание, непосредственно связанное с воспалением. Снижение

его активности, наряду с уменьшением выраженности клинических и функциональных проявлений, достижение полного контроля становятся основными критериями оценки эффективности назначенной терапии. Принято считать, что воспаление при БА сопряжено с развитием CD4+Th2-клеточной иммунной реакции в респираторном тракте, характеризуется усилением продукции IL-4, IL-5, IL-13 и минимальными изменениями в продукции цитокинов Th1. В настоящей работе были представлены индивидуальные варианты формирования воспалительной реакции, которые вносят дополнительный вклад в общее воспаление, модифицируя клиническое течение астмы.

Тяжесть нарушений функции внешнего дыхания и гиперреактивность дыхательных путей неоднозначно связаны с разными типами воспаления. Наиболее универсальным молекулярным свидетелем избыточной реакции бронхов на холодовой 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.

Нет сомнений в том, что оксидативный стресс – раннее ключевое событие, интенсифицирующее многие патологические процессы, особенно в легких. Под действием экзогенных и при непосредственном участии эндогенных факторов вырабатываются активные формы кислорода, которые посредством супероксиддисмутазы или спонтанно преобразуются в H_2O_2 . Под действием H_2O_2 в совокупности с другими сильными окислителями происходит повреждение белковых, липидных структур клеток, нуклеиновых кислот, появление у них антигенных свойств, хемоаттрактантов, с привлечением фагоцитирующих клеток в очаг воспаления и формированием «порочного круга» в респираторном тракте [7].

Повышенное содержание H_2O_2 в КВВ было характерно для всех обследованных нами больных, в то же время, имело место явное нарастание H_2O_2 у лиц, активно реагировавших на провокацию холодным воздухом. Найденные корреляции между степенью транзиторного сужения дыхательных путей после холодовой бронхопровокации и показателями, отвечающими за 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 T-клеток, модулируя Th1/Th2 баланс в сторону Th2 клеток, способствует аутокринному производству IL-4, играет роль в развитии Th2-опосредованных аллергических обострений при БА [10]. С другой стороны,

некоторые авторы, отметив влияние IL-6 на проходимость центральных дыхательных путей, подчёркивали независимость от аллергического воспаления в бронхах механизм его влияния [16, 22].

Мы обратили внимание на 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 БА, обусловленное его участием в IgE-зависимых механизмах формирования холодовой гиперреактивности дыхательных путей [6]. Важным элементом действия IFN γ на клетки является амплификация рецепторов к ряду цитокинов, в том числе к IL-6 и TNF α .

По всей видимости, у больных 3 группы мы наблюдали эозинофильно-нейтрофильный паттерн воспаления, поскольку, наряду с высокими значениями IL-5, уровень IL-8 – мощного хемоаттрактанта нейтрофилов, в 1,5-2 раза превышал таковой 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 [21]. 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 холодовое воздействие, поскольку известно, что продолжительный контакт с холодом увеличивает количество воспалительных клеток, концентрацию лейкотриенов и изменяет цитокиновый профиль в легких даже у здоровых людей [17].

У больных с изолированной реакцией на гипотонический 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 последующей реакцией бронхов на дистиллированную воду, что может представлять большой интерес не только 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. В некоторых работах показано, что IL-4 может проявлять неожиданные для себя специфические эффекты, участвуя в регуляции сокращения гладкомышечных клеток дыхательных путей посредством 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 [15]. В последних работах обнаружено, что гистамин, посредством IL-4, увеличивает продукцию H_2O_2 брон-

хиальными эпителиальными клетками через экспрессию двойной оксидазы и H1-гистаминовые рецепторы [20].

Если у пациентов с изолированной реакцией на стимулы прослеживалась четкая связь бронхиальной проходимости и реактивности дыхательных путей с нарушением свободно-радикального 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 H₂O₂ в КВВ и продукцией цитокинов, поскольку мы наблюдали как усиление образования H₂O₂, 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 Т-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 нитроксидазные реакции. Существуют данные, что IL-4, совместно с IL-10, повышает активность аргиназы и, тем самым, снижает продукцию L-аргинаина, участвующего в синтезе NO [2].

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 [9, 18, 19].

Считается, что длительно высокий уровень 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, более чем в половине случаев имели неконтролируемое течение болезни, 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 ее расслабление под влиянием эндо- и экзогенных агонистов и т.д. В условиях хронического стресса на фоне длительно протекающей БА происходит постепенное истощение функциональных резервов надпочечников, уменьшение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов с развитием относительной недостаточности, когда концентрация эндогенных глюкокортикоидов 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 [14, 18, 19]. 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 соавт. [8] были представлены сообщения о снижении функциональной активности β_2 -адренорецепторов у больных БА, которая коррелирует со степенью тяжести болезни и контролем над ней. 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 БА. Так, Д.Е.Наумов и соавт. [2] нашли статистически значимое снижение реакции β_2 -адренорецепторов на адреналин у астматиков, гомозиготных по Arg16Arg. Выявленные клинико-функциональные особенности свидетельствовали об изменении чувствительности рецепторов в случае замены 16 аминокислоты на аргинин. С другой стороны, неизвестно, насколько значима для этих больных роль TRPM8 рецепторов, экспрессированных в дыхательных путях, либо TRPV4, TRPV1, как предполагаемых участников осмотической бронхоконстрикторной реакции [12, 24].

Проведенные нами исследования показали, что существуют различные подтипы воспалительной реакции у больных БА с холодовой и осмотической гиперреактивностью дыхательных путей, которые могут существовать как отдельные молекулярные фенотипы. Каждый молекулярный фенотип связан и может сопровождать определенные структурные изменения в респираторном тракте. Эти молекулярные фенотипы имеют потенциальную клиническую значимость, поскольку могут указывать нам возможный паттерн бронхиальной гиперреактивности, тяжесть течения астмы, терапевтические подходы к достижению лучшего контроля над заболеванием, открывают новые возможности в понимании механизмов, ответственных за формирование бронхообструктивного синдрома и перспективы его

коррекции.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Генетический полиморфизм термочувствительных катионных каналов TRPM8 как фактор предрасположенности к холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных хроническими obstructивными заболеваниями легких / Д.Е.Наумов [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2012. Вып.45. С.8–14.
2. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Тер. арх. 2005. №1. С.82–87.
3. Перельман Ю.М., Приходько А.Г. Диагностика холодовой гиперреактивности дыхательных путей: методические рекомендации. Благовещенск, 1998. 8 с.
4. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П. Гиперреактивность дыхательных путей. Владивосток: Дальнаука, 2011. 204 с.
5. Приходько А.Г. Реакция дыхательных путей на гипоосмолярный стимул // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2005. Вып.21. С.47–52.
6. 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.
7. Соодаева С.К. Свободнорадикальные механизмы повреждения при болезнях органов дыхания // Пульмонология. 2012. №1. С.5–10.
8. Ушакова Е.В., Пирогов А.Б., Колосов В.П. Функциональное состояние мембранно-клеточной бета-адренергической рецепции и глюкокортикоидной функции надпочечников у больных бронхиальной астмой // IV Съезд врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока: тез. докл. Благовещенск, 2011. С.105–107.
9. Chrousos G.P. The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation // N. Engl. J. Med. 1995. Vol.332, №20. P.1351–1363.
10. Dienz O., Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses // Clin. Immunol. 2009. Vol.130, №1. P.27–33.
11. Cold temperature induces hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism / M.C.Li [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. 2011. Vol.128, №3. P.626–634.
12. Lin R.-L., Don Hayes Jr., 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.
13. General considerations for lung function testing / M.R.Miller [et al.] // Eur. Respir. J. 2005. Vol.26, №1. P.153–161.
14. 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.

15. Interleukin-4 activates large-conductance, calcium-activated potassium (BKCa) channels in human airway smooth muscle cells / G.Martin [et al.] // Exp. Physiol. 2008. Vol.93, №7. P.908–918.

16. Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function / W.A.Neuveu [et al.] // Respir. Res. 2010. Vol.11. P.28.

17. Inhalation of cold air increases the number of inflammatory cells in the lungs in healthy subjects / K.Larsson [et al.] // Eur. Respir. J. 1998. Vol.12, №4. P.825–830.

18. Endocrine-immune interactions in adrenal function of asthmatic children on inhaled corticosteroids / K.N.Priftis [et al.] // Neuroimmunomodulation. 2009. Vol.16, №5. P.333–339.

19. Dysregulation of the stress response in asthmatic children / K.N.Priftis [et al.] // Allergy. 2009. Vol.64, №1. P.18–31.

20. Histamine stimulates hydrogen peroxide production by bronchial epithelial cells via histamine H1 receptor and dual oxidase / B.Rada [et al.] // Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 2014. Vol.50, №1. P.125–134.

21. 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.

22. 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.

23. Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant / A.S.Sabnis [et al.] // Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 2008. Vol. 39, №4. P. 466–474.

24. Taylor-Clark T.E., Undem B.J. Transduction mechanisms in airway sensory nerves // J. Appl. Physiol. 2006. Vol.101, №3. P.950–959.

REFERENCES

1. Naumov D.E., Perelman J.M., Kolosov V.P., Maksimov V.N., Voevoda M.I., Kolosov A.V., Zhou X.D., Li Q. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2012; 45:8–14.
2. Pokrovskiy V.I., Vinogradov N.A. *Terapevticheskiy arkhiv* 2005; 1:82–87.
3. Perelman J.M., Prikhodko A.G. *Diagnostika kholodovoy giperreaktivnosti dykhatel'nykh putey: metodicheskie rekomendatsii* [The diagnosis of cold airway hyperresponsiveness: methodic guidelines]. Blagoveshchensk; 1998.
4. Prikhodko A.G., Perelman J.M., Kolosov V.P. *Giperreaktivnost' dykhatel'nykh putey* [Airway hyperresponsiveness]. Vladivostok: Dal'nauka; 2011.
5. Prikhodko A.G. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2005; 21:47–52.
6. Prikhodko A.G., Makarova G.A. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2009; 34:13–16.
7. Soodaeva S.K. *Pul'monologiya* 2012; 1:5–10.
8. Ushakova E.V., Pirogov A.B., Kolosov V.P. *IV S"ezd vrachey-pul'monologov Sibiri i Dal'nego Vostoka: tezis dokladov* (IV Meeting of Pulmonologists of Siberia and Far East: abstracts of reports). Blagoveshchensk; 2011:105–107.

9. Chrousos G.P. The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332(20):1351–1363.
10. Dienz O., Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin. Immunol.* 2009; 130(1):27–33.
11. Li M.C., Li Q., Yang G., Kolosov V.P., Perelman J.M., Zhou X.D. Cold temperature induces hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 128(3):626–634.
12. Lin R.-L., Don Hayes Jr., Lee L.-Y. Bronchoconstriction induced by hyperventilation with humidified hot air: role of TRPV1-expressing airway afferents. *J. Appl. Physiol.* 2009; 106(6):1917–1924.
13. Miller M.R., Crapo R., Hankinson J., Brusasco V., Burgos F., Casaburi R., Coates A., Enright P., van der Grinten C.P., Gustafsson P., Jensen R., Johnson D.C., MacIntyre N., McKay R., Navajas D., Pedersen O.F., Pellegrino R., Viegi G., Wanger J. General considerations for lung function testing. *Eur. Respir. J.* 2005; 26(1):153–161.
14. 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; 103(14):5496–550.
15. 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; 93(7):908–918.
16. 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; 11:28.
17. Larsson K., Tornling G., Gavhed D., Müller-Suur C., Palmberg L. Inhalation of cold air increases the number of inflammatory cells in the lungs in healthy subjects. *Eur. Respir. J.* 1998; 12(4):825–830.
18. 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; 16(5):333–339.
19. Priftis K.N., Papadimitriou A., Nicolaidou P., Chrousos G.P. Dysregulation of the stress response in asthmatic children. *Allergy* 2009; 64(1):18–31.
20. 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; 50(1):125–134.
21. Rahman I., Adcock I.M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur. Respir. J.* 2006; 28(1):219–242.
22. Rubini A. Interleukin-6 and lung inflammation: evidence for a causative role in inducing respiratory system resistance increments. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 2013; 12(5). P.315–321.
23. 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; 39(4):466–474.
24. Taylor-Clark T.E., Undem B.J. Transduction mechanisms in airway sensory nerve. *J. Appl. Physiol.* 2006; 101(3):950–959.

Поступила 21.10.2014

Контактная информация

Анна Григорьевна Приходько,

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональных методов исследования дыхательной системы,

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

E-mail: prih-anya@ya.ru

Correspondence should be addressed to

Anna G. Prikhodko,

MD, PhD, Leading staff scientist of Laboratory of Functional Research of Respiratory System, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration SB RAMS, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: prih-anya@ya.ru