

© ПИРОГОВ А. Б., ПРИХОДЬКО А. Г., ПЕРЕЛЬМАН Ю. М.

УДК [616.233-021.5:612.225(612.112.3/91:57.083.3)]616.248

DOI: 10.20333/25000136-2024-1-64-71

Участие макрофагов и эпителия в реакции бронхов на гиперосмолярный стимул при бронхиальной астме

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

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания, Благовещенск 675000, Российская Федерация

Цель исследования. Изучить цитокиновый и пероксидазный профиль интерстициальных макрофагов бронхов и функциональную активность бронхиального эпителия у больных бронхиальной астмой (БА) с различной реакцией дыхательных путей на гиперосмолярный стимул.
Материал и методы. У 70 больных БА оценивали степень контроля над астмой (АСТ, баллы), функцию внешнего дыхания (ОФВ1, % долж.), реакцию дыхательных путей (ΔОФВ1, %) на бронхопровокационную пробу с ультразвуковой ингаляцией гипертонического (4,5%) раствора натрия хлорида (ИГР), проводили сбор и исследование конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ), индуцированной мокроты (ИМ). В цитологических мазках изучали клеточный состав, активность миелопероксидазы (МПО), степень деструкции бронхиального эпителия, в КВВ – содержание IL-12 и IL-13. В 1 группу (n=25) вошли лица с гиперреактивностью дыхательных путей на гиперосмолярный стимул, во 2 группу (n=45) – с отсутствием гиперреактивности (ΔОФВ1 -18,5±2,8 и -0,78±1,0% соответственно, p<0,001).

Результаты. По уровню АСТ и ОФВ1 больные не имели различий, но в 1 группе регистрировалось меньшее значение СОС25-75 (55,3±3,9 и 69,2±4,4% соответственно, p=0,023). В ИМ количество макрофагов у больных 1 и 2 групп составило 34,9±5,1 и 49,8±4,6% соответственно (p=0,039), МПО 120(120;180) и 60(60;120) пикселей (p=0,016), клеток бронхиального эпителия с тотальным повреждением ядра и цитоплазмы 40(39;50) и 30(25;35) % (p=0,007). В 1 группе после пробы ИГР отмечалось значимое снижение IL-12 (p=0,0002) и IL-13 (p=0,043) в КВВ, а также наблюдалась тесная связь между содержанием макрофагов и значениями МПО (Rs=-0,79; p=0,007) в мокроте, а также между исходной концентрацией IL-12 и СОС25-75 (Rs=0,53; p=0,042).

Заключение. Гиперреактивность дыхательных путей на гиперосмолярный стимул при БА сопряжена с продукцией и расходом IL-12, усилением продукции и экзоцитоза МПО, более выраженной деструкцией и цитолизом эпителиальных клеток и ухудшением проходимости мелких бронхов.

Ключевые слова: бронхиальная астма, осмотическая гиперреактивность дыхательных путей, бронхиальное воспаление, макрофаги, бронхиальный эпителий, миелопероксидаза.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Пирогов АБ, Приходько АГ, Перельман ЮМ. Участие макрофагов и эпителия в реакции бронхов на гиперосмолярный стимул при бронхиальной астме. *Сибирское медицинское обозрение.* 2024;(1):64-71. DOI: 10.20333/25000136-2024-1-64-71

The participation of macrophages and epithelium in the bronchial response to the hyperosmolar stimulus in bronchial asthma

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

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk 675000, Russian Federation

The aim of the research. To study the cytokine and peroxidase profile of bronchial interstitial macrophages and the functional activity of bronchial epithelium in bronchial asthma (BA) patients with different airway responses to the hyperosmolar stimulus.

Material and methods. In 70 BA patients, the degree of asthma control (ACT, points), external respiration function (FEV1, % predicted), airway response (ΔFEV1, %) to the bronchoprovocation test with ultrasonic inhalation of hypertonic (4.5%) sodium chloride solution (IHS), the collection and study of exhaled breath condensate (EBC) and induced sputum (IS) was performed. In cytological smears, the cellular composition, myeloperoxidase (MPO) activity, the degree of destruction of the bronchial epithelium were studied. The contents of IL-12 and IL-13 in EBC were measured. Group 1 (n=25) included subjects with airway hyperresponsiveness to hyperosmolar stimulus, Group 2 (n=45) included subjects with absent hyperresponsiveness (ΔFEV1 -18.5±2.8 and -0.78±1.0%, respectively, p<0.001).

Results. Patients of both groups had no differences in ACT and FEV1, but in first group a lower value of FEF25-75 was recorded (55.3±3.9 and 69.2±4.4%, respectively, p=0.023). The number of macrophages in IS was 34.9±5.1 and 49.8±4.6% in patients of the 1st and 2nd groups, respectively (p=0.039). The MPO was 120 (120;180) and 60 (60;120) pixels (p=0.016), bronchial epithelial cells with total damage to the nucleus and cytoplasm were 40% (39;50) and 30% (25;35) (p=0.007). In the 1st group, there was a significant decrease in IL-12 (p=0.0002) and IL-13 (p=0.043) in EBC after the IHS test, and a close relationship was observed between the content of macrophages and MPO values (Rs=-0.79; p=0.007) in sputum, as well as between the baseline concentration of IL-12 and FEF25-75 (Rs=0.53; p=0.042).

Conclusion. Airway hyperresponsiveness to the hyperosmolar stimulus in BA patients is associated with production and consumption of IL-12, increased production and exocytosis of MPO, more pronounced destruction and cytolysis of epithelial cells as well as worsening of the patency of small bronchi.

Key words: bronchial asthma, airway osmotic hyperresponsiveness, bronchial inflammation, macrophages, bronchial epithelium, myeloperoxidase.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Pirogov AB, Prikhodko AG, Perelman JM. The participation of macrophages and epithelium in the bronchial response to the hyperosmolar stimulus in bronchial asthma. *Siberian Medical Review.* 2024;(1):64-71. DOI: 10.20333/25000136-2024-1-64-71

Введение

Бронхиальная астма (БА) чаще всего ассоциируется с аллергией и воспалением 2-го типа. Однако механизмы, которые связывают воспаление дыхательных путей со структурно-функциональными изменениями эпителиальных клеток и макрофагов, изучены недостаточно. Одним из факторов, объединяющих участие бронхиального эпителия и мононуклеарных фагоцитов в патогенезе БА, является их способность к экспрессии IL-33, поляризующего наивные CD4+T-клетки (по GATA-3-, STAT6- и IL-4-независимым механизмам) в субпопуляцию Th2-клеток, продуцирующих IL-5 и IL-13, что приводит к перепрограммированию макрофагов в альтернативно активированную форму M2 [1, 2]. Установлено, что при первом воздействии экзогенных аллергенов на дыхательные пути главным источником IL-33 выступают клетки эпителия, а мишенями для данного цитокина является широкий спектр клеток, секретирующих медиаторы воспаления и несущих на своей поверхности рецептор ST2, посредством которого IL-33 индуцирует Th2 иммунный ответ [1, 2].

При аллергической форме БА активированные IL-33 M2 макрофаги стимулируют продукцию Th2-цитокинов, усиливающих Th2-ответ и экспрессию факторов фибро- и коллагеногенеза, участвуя в ремоделировании дыхательных путей [3]. Экспрессируемый M2a макрофагами IL-13 является ключевым цитокином в Th2 иммунном ответе при БА, играя роль центрального регулятора синтеза IgE, гиперплазии бокаловидных клеток, гиперсекреции слизи, индуктора субэпителиального фиброза, активации эозинофилов и бронхиальной гиперреактивности [4, 5, 6, 7].

Для неаллергической БА с неконтролируемым течением болезни и резистентностью к глюкокортикоидной терапии характерно развитие Th1/Th17 иммунного ответа с увеличением продукции провоспалительных цитокинов и поляризацией макрофагов по M1 фенотипу [5, 8]. M1 макрофаги стимулируются IFN- γ [5, 8], поляризующим иммунный ответ по Th1 типу. IFN- γ повышает дифференцировку наивных CD4+Th0 в CD4+Th1, стимулируя процессинг антигенов и экспрессию поверхностных костимулирующих молекул на антигенпрезентирующих клетках (АПК) [1, 9]. Иммунорегуляторный IL-12, выделяемый активированными макрофагами и АПК, индуцирует транскрипцию гена IFN- γ и потенцирует Th1 иммунный ответ. Он включает в своем семействе IL-23, IL-27, IL-35 и состоит из двух ковалентно связанных субъединиц IL-12p35 и IL-12p40, образующих IL-12p70. Субъединица p40 участвует в патогенезе БА [10, 11]. Продукция IFN- γ макрофагами под контролем IL-12 необходима для их самоактивации и активации близлежащих клеток. Активирующее воздействие IFN- γ на макрофаги

стимулирует пути процессинга и презентации антигена, индукцию цитозольных компонентов фагоцитарной NADPH-оксидазы и секрецию провоспалительных цитокинов [1, 9]. Благодаря этому IFN- γ участвует в прайминге респираторного взрыва, активируя синтез и высвобождение активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ), образующихся в фагоцитах при взаимодействии лизосомной миелопероксидазы (МПО) с пероксидом водорода [9, 12].

Th1 и Th2 иммунные реакции детерминируют не только M1 и M2 макрофаги, но и бронхиальный эпителий, отвечающий на активацию вирусами продукцией CXCL2, CXCL8, IL-12 и CCL20, что стимулирует локальный синтез IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18, IL-36 и TNF- α (эпителиальный ответ типа 1), а на активацию аллергенами – продукцией TSLP, IL-31, CCL-26, IL-25, IL-33, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25 (эпителиальный ответ типа 2) [13]. Поэтому весьма актуально изучение функционального состояния макрофагов и эпителия бронхов астматиков, по-разному реагирующих на воздействие различных триггеров.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении цитокинового и пероксидазного профиля интерстициальных макрофагов бронхов и состояния бронхиального эпителия у больных БА с различной реакцией дыхательных путей на гиперосмолярный стимул.

Материал и методы

Наблюдательное клиническое исследование включало 70 больных неаллергической БА легкой и средней степени тяжести, неконтролируемого течения [14]. Критерии включения: возраст 18-65 лет, верифицированный клинический диагноз персистирующей БА [14], объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1) более 70% должной величины, информированное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии исключения: тяжелая сопутствующая патология, острые респираторные заболевания в течение предшествующих 4 недель.

Дизайн исследования предусматривал однократный контроль симптомов заболевания по вопроснику Asthma Control Test (ACT, баллы, Quality Metric Inc., 2002), спирометрию форсированного выдоха с определением параметров вентиляционной функции легких, оценкой реакции дыхательных путей (Δ ОФВ1, %) на бронхопровокационную пробу с ультразвуковой ингаляцией гипертонического (4,5%) раствора натрия хлорида (ИГР) [15], сбор и исследование конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ), индуцированной мокроты (ИМ). Процедуры тестирования и забора биологического материала были стандартизованы. Условия функционального тестирования соответствовали существующим международным и Российским протоколам.

Протокол проведения бронхопровокационной пробы включал две последовательные ингаляции, стандартизованные по объему, температуре и уровню pH ингалируемых растворов длительностью 3 минуты каждая при равномерном произвольном спокойном дыхании: при первой ингаляции использовали изотонический (0,9%) раствор натрия хлорида (NaCl), при второй – 4,5% раствор NaCl. Проба ИГР проводилась под контролем спирометрии с оценкой параметров бронхиальной проходимости до и после выполненной провокации на 1 и 5 минутах. Падение ОФВ1 (Δ , %) после ингаляции 4,5% NaCl более чем на 10% от исходной величины служило критерием гиперосмотической гиперреактивности дыхательных путей [15].

Сбор ИМ проводили в первую половину дня с анализом не позднее 2 часов после получения. Индукцию мокроты осуществляли с помощью ингаляции 3-, 4- и 5%-го раствора NaCl сеансами по 7 минут под постоянным контролем ОФВ1 [15, 16]. Цитологические мазки подготавливали стандартным методом: высушивали в воздушной среде термостата ТМ-2 (5-10 мин., 37°C), далее последовательно проводили в течение 10 мин. фиксацию в парах 40%-го раствора формалина, окраску 4-5%-м водным красителем Романовского-Гимза при pH 6,8. Микропрепараты оценивали с помощью светооптической иммерсионной микроскопии, подсчитывая не менее 400 клеток в 100 полях зрения. Полученное число клеток отражали в процентах [15, 17]. Для оценки целостности клеток бронхиального эпителия использовали шкалу степени деструкции и интенсивности цитолиза: 0 – нормальная структура; 1 – частичное (не более 1/2) деструктивное повреждение цитоплазмы, нормальная структура ядра; 2 – значительная (более 1/2), но неполная деструкция цитоплазмы, частичное повреждение ядра; 3 – полная деструкция цитоплазмы, значительная деструкция ядра; 4 – полная деструкция с распадом цитоплазмы и ядра. Суммарный индекс деструкции клеток (ИДК) и индекс интенсивности цитолиза клеток (ИЦК) определяли по формулам: $ИДК = (n_1 + n_2 + n_3 + n_4) / 100$; $ИЦК = n_4 / (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$ где 0, 1, 2, 3, 4 – номера классов деструкции; n_0, n_1, n_2, n_3, n_4 – количество клеток соответствующего класса.

Совокупную активность МПО в азурофильных гранулах фагоцитов (макрофагов и нейтрофилов) определяли цитохимически методом Грэхема-Кнолля [17] с докраской мазков после обработки бензидином и перекисью водорода водным раствором азура-2. По оптической плотности фермента в исследуемых клетках рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) МПО (в пикселях). Цифровую обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения для микроденсиметрии Image Tool и Optika Vision Pro (Италия), Mac Biophotonics Image S (США).

Образцы КВВ собирали с помощью аппарата ECoScreen Turbo (VIASUS Healthcare GmbH, Германия) [15] до и через 5 минут после окончания бронхопровокационной пробы ИГР. Сбор КВВ проводили в течение 20 мин. при произвольном спокойном дыхании ртом, предварительно ополоснув двукратно ротовую полость дистиллированной водой. Носовой зажим использовался для исключения вентиляции воздуха носом. Пары из выдыхаемого воздуха конденсировались в охлаждающей камере при температуре -20°C. После сбора и разморозки КВВ аликвотировали в полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл, замораживали и хранили при температуре -80°C до момента анализа. Измерение концентрации IL-12 и IL-13 в КВВ (пг/мл) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа на полуавтоматическом ИФ анализаторе Multiskan Fc (Termo Fisher Scientific, Финляндия) с использованием коммерческого набора «Bender Med Systems» (Австрия) с моноклональными антителами к интерлейкинам, сорбированными на поверхности лунок разборного полистирольного планшета, согласно протоколу производителя.

Исследование было выполнено в соответствии с нормами Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», международными этическими принципами проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), одобрено локальным комитетом Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания по биомедицинской этике.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартных методов вариационной статистики. Для межгрупповых сравнений при нормальном типе распределения использовали непарный критерий t (Стьюдента), при негауссовом распределении – критерий Манна-Уитни. Для парных сравнений изменений показателей в динамике до и после проведения бронхопровокационной пробы использовали критерий Уилкоксона.

Количественные данные представлены в виде $M \pm SD$ в выборках с нормальным распределением, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное (среднеквадратическое) отклонение, а также в виде медианы и квартилей ($Me (Q1; Q3)$) в случаях распределений, отличных от нормального. С целью определения степени связи между 2 случайными величинами использовали непараметрический коэффициент корреляции Спирмена. В качестве критического уровня значимости принимали значение p менее 0,05.

Результаты и обсуждение

По данным спирометрии, после аэрозоля солевого раствора величина Δ ОФВ1 варьировала в пределах $-5(-10,5; 0,01)\%$ с максимальным снижением показателя до $-63,8\%$. Дальнейшее распределение больных в группы осуществлялось по наличию или отсутствию реакции дыхательных путей (Δ ОФВ1) на ингаляцию $4,5\%$ NaCl: в 1 группу ($n=25$) вошли лица с гиперреактивностью на гиперосмолярный стимул, во 2 группу ($n=45$) – с отсутствием гиперреактивности (Δ ОФВ1 $-14(-26; 11)$ и $-3,4(-5,8; 1,4)\%$, соответственно $p<0,001$). Больные обеих групп не имели отличий по возрасту ($39,5(28; 45)$ и $39(31; 46)$ лет, $p=0,324$), уровню контроля над заболеванием (АСТ $14(11;16)$ и $14(11,5;17)$ баллов, $p=0,440$), ОФВ1 ($88,3\pm 16,0$ и $92,3\pm 18,8\%$ долж., $p=0,262$), ОФВ1/ЖЕЛ ($69,7\pm 9,0$ и $73,4\pm 8,1$, $p=0,171$). В то же время у лиц 1 группы регистрировалось более низкое значение показателя СОС25-75, характеризующего проходимость мелких бронхов ($55,7(39,2; 69,0)$ и $66,1(47,4; 88,8)$), соответственно $p=0,023$.

Всем больным перед индукцией мокроты осуществлялось введение аэрозоля β_2 -агониста короткого действия (сальбутамол 400 мг) и через 15 минут последовательно выполнялись ингаляции 3, 4 и 5-ми растворами хлорида натрия под контролем ОФВ1. Как видно из табл. 1, больные 1 группы более активно реагировали на ингаляцию β_2 -агониста и солевых растворов при сборе ИМ. Удовлетворительные образцы мокроты были получены у 15 человек 1 группы и 25 больных 2 группы, остальные пациенты эффективно не продуцировали мокроту.

Содержание нейтрофилов и эозинофилов в мокроте у пациентов исследуемых групп достоверно не различалось, тогда как количество макрофагов у лиц 1 группы было более низким, чем у лиц 2 группы (рис. 1). Значения СЦК МПО, ИДК и ИЦК бронхиального эпителия (рис. 1, табл. 2) были более высокими у больных с гиперреактивностью дыхательных путей на пробу ИГР относительно лиц, не реагировавших на стимул. Эпителиальных клеток с неповрежденной структурой (0 класс деструкции) в 1 группе насчитывалось существенно меньше, а клеток эпителия

с тотальным повреждением ядра и цитоплазмы (4 класс деструкции) больше, чем во 2 группе (табл. 2). Отличий в содержании эпителиальных клеток 1, 2 и 3 классов деструкции в микропрепаратах ИМ пациентов 1 и 2 групп не регистрировалось (табл. 2). В обеих группах отмечена тесная корреляция между количеством макрофагов и нейтрофилов мокроты ($R_s=-0,67$; $p=0,006$ и $R_s=-0,69$; $p=0,004$). Кроме того, у больных 1 группы содержание макрофагов в мокроте имело обратную связь с СЦК МПО ($R_s=-0,79$; $p=0,007$).

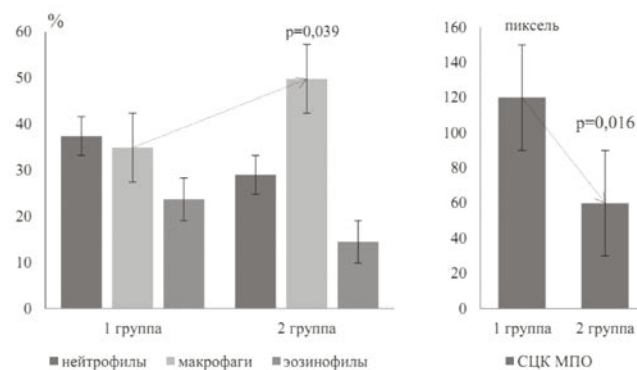


Рисунок 1. Клеточный состав (а) и активность миелопероксидазы (б) в макрофагах и нейтрофилах индуцированной мокроты.

Figure 1. Cellular composition (a) and myeloperoxidase activity (b) in macrophages and neutrophils of induced sputum.

Нами не обнаружено значимых межгрупповых различий содержания интерлейкинов 12 и 13 в КВВ как до, так и после бронхопровокационного тестирования (рис. 2). Тем не менее в обеих группах концентрация ИЛ-12 после проведения пробы ИГР снижалась, причем более значимые изменения регистрировались в 1 группе, в которой наблюдалась статистически значимая связь средней силы между ИЛ-12 и СОС25-75 перед бронхопровокацией ($R_s=0,53$; $p=0,042$). В этой же группе регистрировалось снижение содержания ИЛ-13 в КВВ после ингаляции гипертонического раствора, тогда как во 2 группе значения показателя значимо не отличались от исходной величины (рис. 2).

Таблица 1

Изменение ОФВ1 в процессе сбора индуцированной мокроты

Table 1

FEV1 change during induced sputum collection

Параметр	1 группа	2 группа	p
Δ ОФВ1бп, %	17,0(9,9; 23,4)	4,95(3,2; 11,1)	0,003
Δ ОФВ1 им, %	-1,90(-9,84; 3,45)	0,20(-3,50; 4,19)	0,080

Примечание: Δ ОФВ1бп - изменение ОФВ1 после введения сальбутамола; Δ ОФВ1 им – изменение ОФВ1 после сбора индуцированной мокроты; p – здесь и далее значимость различий между 1 и 2 группой.

Note: Δ ОФВ1бп – the change in FEV1 after salbutamol introduction; Δ ОФВ1им – the change in FEV1 after collection of induced sputum; p – hereinafter: the significance of differences between groups 1 and 2.

Структурная целостность клеток бронхиального эпителия в индуцированной мокроте

Table 2

Structural integrity of bronchial epithelial cells in induced sputum

Параметр	1 группа	2 группа	p
ИДК эпителия усл. ед.	0,50(0,44; 0,68)	0,39(0,35; 0,50)	0,048
ИЦК эпителия, усл. ед.	0,44(0,39; 0,60)	0,30(0,25; 0,35)	0,007
0 класс деструкции, %	50(32; 55)	61(50; 70)	0,047
1 класс деструкции, %	6,5(2; 10)	4,5(4; 10)	0,730
2 класс деструкции, %	2,5(0,1; 3)	1,0(0,1; 1,0)	0,401
3 класс деструкции, %	0,1(0,1; 0,1)	0,1(0,1; 0,1)	0,103
4 класс деструкции, %	40(39; 50)	30(25; 35)	0,007

Количество IL-13 во 2 группе после пробы коррелировало с числом макрофагов в мокроте ($R_s=0,70$; $p=0,043$). Более высокому исходному содержанию макрофагов соответствовали меньшие изменения IL-13 после провокации.

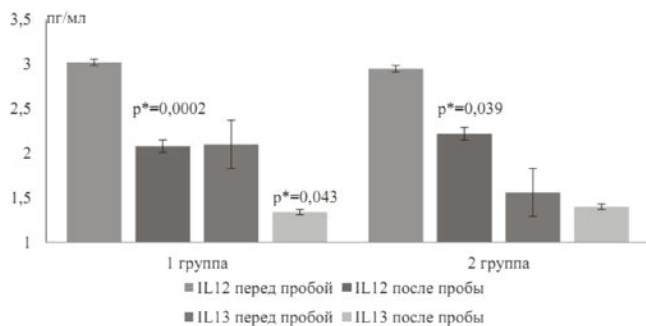


Рисунок 2. Концентрации IL-13 и IL-12 в конденсате выдыхаемого воздуха до и после бронхопровокационной пробы.

Примечание: p^* – статистическая значимость различий показателей до и после пробы ИГР (критерий Уилкоксона).

Figure 2. Concentrations of IL-13 and IL-12 in exhaled breath condensate before and after bronchoprovocation test.

Note: p^* – statistical significance of differences in the parameters before and after the IHS test (Wilcoxon test).

Снижение содержания IL-12 и IL-13 после пробы ИГР в группе больных с гиперреактивностью на гипертонический раствор обусловлено усиленной утилизацией интерлейкинов, свидетельствующей об участии в бронхоспазме как Th2, так и Th1 цитокинов. В то же время снижение концентрации IL-12 в дыхательных путях у этих больных происходило интенсивнее регистрируемых изменений IL-13, что предполагало инертность иммунного ответа Th2 и большую подвижность Th1, чья экспрессия регулируется IL-12 и IFN- γ , индуцированным IL-12. Наблюдаемое во 2 группе расхождение IL-12, скорее всего, было вызвано участием цитокина в эскалации бронхиально-

го воспаления, лежащего в основе БА, поскольку обе группы характеризовались неконтролируемым течением болезни.

К сигналам, ингибирующими продукцию IFN- γ , в первую очередь относят IL-4, подавляющий IFN- γ -зависимую активацию эффекторных функций макрофагов, а также IL-5, IL-10, IL-13 [1, 9]. Отсутствие во 2 группе после пробы ИГР роста или снижения концентрации IL-13 служило проявлением иммунного ответа Th2, реализуемого при помощи активируемого IL-13 сигнального пути с участием STAT6 [2, 4], индукции экспрессии фактора транскрипции Th2 GATA-3, который активирует секрецию Th2 цитокинов, ингибирует специфичные факторы транскрипции Th1 типа, обуславливая аллергическое воспаление, гиперреактивность и ремоделирование дыхательных путей [18]. Если поддержанию стабильного уровня IL-13 в дыхательных путях больных без гиперреактивности на ИГР сопутствовало возможное снижение уровня продукции IFN- γ , то мобилизация IL-12 в дыхательных путях больных с осмотической гиперреактивностью приводила к активации IFN- γ . Следует отметить, что молекулярные механизмы, регулирующие развитие Th1, объединяются связанными сигнальными путями IL-12/STAT4 и IFN- γ /STAT1 (путь T-bet), активируемыми IL-12 и IFN- γ . Путь T-bet способен потенцировать сигналы активатора транскрипции Th1 STAT4 в генерации Th1, блокируя супрессирующее влияние GATA-3 на STAT4 и подавляя дифференцировку Th2 [19].

Th1 ответ, развивающийся в дыхательных путях пациентов 1 группы под воздействием гиперосмолярного стимула и стимулирующий поляризацию макрофагов по M1 типу, ассоциировался с высоким уровнем пероксидазной активности фагоцитов, на что указывали более высокие, чем во 2 группе, значения СЦК МПО, что подтверждали корреляционные взаимосвязи. Повышенное содержание и активность МПО у лиц с гиперосмотической гиперреактивностью дыхательных путей свидетельствовало об активизации

респираторного взрыва, увеличении образования свободных радикалов и АФК, усилении функционирования чрезвычайно токсичной системы «H₂O₂–МПО–галогены/АФГ». Высокая активность фагоцитарной МПО у больных 1 группы была обусловлена не только активностью фермента в нейтрофилах, но и пероксидазной функцией макрофагов, продуцирующих и накапливающих фермент в лизосомах, а затем секретирующих его в интерстиций бронхов при дегрануляции и цитолизе. Потеря дегранулирующими макрофагами лизосомных гранул, в которых депонировался и активировался фермент, сопровождалась лабильзацией мембран лизосом, что приводило к деструкции, фрагментации и лизису цитоплазмы, а затем и ядра клеток. С цитолизом было связано более низкое количество макрофагов в мокроте больных 1 группы по сравнению со 2 группой.

Имеющиеся в настоящее время представления свидетельствуют о формировании у больных астмой особого фенотипа активированного бронхиального эпителия с выраженными нарушениями структуры и десмо-эпителиальной барьерной функции дезинтеграцией, десквамацией, дисрегенерацией и метаплазией клеточного пласта, который стимулирует выработку факторов роста множества хемокинов и провоспалительных цитокинов и дальнейшее ремоделирование дыхательных путей [6, 7, 20]. Поэтому вполне объясним высокий уровень эпителиоцитов 4 класса деструкции, наблюдаемый в мокроте больных с гиперреактивностью на гиперосмолярный триггер как свидетельство повышенной агрессии воспалительных медиаторов по отношению к эпителию. Воспалительная альтерация и высокая деструктивно-цитолитическая активность эпителия дыхательных путей в ответ на гиперосмолярный стимул у этих больных связаны с высвобождением IL-12, активацией кислородного взрыва и пероксидазной функции макрофагов, увеличением выброса во внеклеточную среду АФГ, АФК и других продуктов оксидативного/галогенирующего стресса.

Повреждение, развивающееся вследствие активации респираторного взрыва и IFN- γ -индуцированной продукции АФК в фагоцитах, рассматривается в качестве одного из главных катализаторов деструкции и цитолиза эпителия при неаллергическом фенотипе БА, диагностированном в обеих группах. В морфофункциональном выражении неаллергический фенотип астмы предполагает аллергическое воспаление дыхательных путей «Th2 низкого» подтипа, которое отличается от аллергического воспаления «Th2 высокого» подтипа доминирующим профилем межклеточных сигнальных молекул [13]. В частности, при селективной трансгенной экспрессии рецептора координатора Th1 иммунного ответа IFN- γ на эпи-

тели дыхательных путей было показано, что IFN- γ противодействует аллергическому механизму развития БА, подавляя секрецию слизи и эозинофилию независимо от активации клеток Th2. В свою очередь, ингибирование GATA-3 вызывает увеличение уровня экспрессии T-bet и IFN- γ , что приводит к ослаблению аллергического фенотипа болезни [13].

Ввиду того, что в дыхательных путях больных 2 группы поддерживалась стабильная концентрация IL-13, направляющего иммунный ответ в сторону Th2 и секретируемого как M2a макрофагами, так и клетками бронхиального эпителия, поляризация последнего, скорее всего, происходила по Th2 фенотипу. Согласно данным ряда авторов, ассоциированный с CD4+Th2 фенотип бронхиального эпителия экспрессирует IL-13 совместно с IL-33, TSLP, CCL5 (Rantes), CCL7 (MCP-3), CCL17 (TARC), CCL22 [13,20,21]. Находящиеся в одном ряду с IL-13 хемокины CCL17 и CCL22 играют заметную роль в привлечении Th2-клеток путем связывания с рецептором CCR4, поскольку его активация является ключевым событием для специфической хемоаттракции Th2. Многофакторные аларминовые цитокины TSLP, IL-25 и IL-33, секретируемые бронхиальным эпителием в ответ на стрессорные повреждения, стимулируют дифференцировку Т-хелперов в сторону фенотипа Th2. Эффективно продуцируя TSLP, эпителий создает локальную микросреду, поддерживающую Th2-поляризованное воспаление в паренхиме бронхов [13].

Стабильное содержание IL-13 в дыхательных путях, не реагирующих на гиперосмолярный стимул, может быть расценено в пользу большей значимости аллергического звена в развитии воспаления у больных 2 группы по сравнению с механизмом воспаления у пациентов 1 группы. Обнаруженное в 1 группе функциональное состояние бронхиального эпителия, характеризующееся выраженной деструкцией, тотальным разрушением и цитолизом клеток, по-видимому, в меньшей степени связано с секрецией IL-33, чем во 2 группе, так как высвобождение иммунологически активного полноразмерного IL-33 (IL-33FL) из эпителиальных клеток опосредовано не клеточным некрозом, а пуринергической рецептор-зависимой передачей сигнала или DUOX1-зависимой активацией сигнального пути EGFR в эпителии, активированном аллергенами или вирусами [20]. Продукция IL-33 в бронхиальном эпителии больных 2 группы могла быть обусловлена более сохранной, чем в 1 группе, структурной организацией эпителиального пласта, большим содержанием клеток нормального строения и меньшим количеством клеток с полным распадом цитоплазмы и ядра.

Заключение

Таким образом, у больных БА, не реагирующих на ингаляцию гипертонического раствора, наблюдается более низкая пероксидазная активность интерстициальных макрофагов, перепрограммируемых в М2 и экспрессирующих IL-13, с менее значимыми деструктивно-цитолитическими изменениями бронхиального эпителия, активируемого по Th2 фенотипу. Появление гиперосмотической гиперреактивности дыхательных путей при БА сопряжено с продукцией и расходом IL-12, поляризацией макрофагов в фенотип М1, активацией фагоцитарного респираторного взрыва, сопровождающегося усилением продукции и экзоцитоза МПО, эскалацией воспаления, агрессивным влиянием оксидантов на эпителиальный покров, выраженной деструкцией и цитолизом эпителиальных клеток и более значимыми нарушениями проходимости мелких бронхов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность кандидату медицинских наук Пироговой Наталье Алексеевне за консультации при подготовке рукописи.

Литература / References

1. Chen W, Chen S, Yan C, Zhang Y, Zhang R, Chen M, Zhong S, Fan W, Zhu S, Zhang D, Lu X, Zhang J, Huang Y, Zhu L, Li X, Lv D, Fu Y, Iv H, Ling Z, Ma L, Jiang H, Long G, Zhu J, Wu D, Wu B, Sun B. Allergen protease-activated stress granule assembly and gasdermin D fragmentation control interleukin-33 secretion. *Nature Immunology*. 2022;23(7):1021-30. DOI: 10.1038/s41590-022-01255-6
2. Хаитов МР, Гайсина АР, Шиловский ИП, Смирнов ВВ, Раменская ГВ, Никонова АА, Хаитов РМ. Роль интерлейкина 33 в патогенезе бронхиальной астмы. Новые экспериментальные данные (Обзор). *Биохимия*. 2018;83(1):19-33. [Khaitov MR, Gaisina AR, Shilovskiy IP, Smirnov VV, Nikonova AA, Khaitov RM, Ramenskaia GV. The role of interleukin-33 in pathogenesis of bronchial asthma. New experimental data. *Biochemistry* (Moscow). 2018;83(1):13-25. (In Russian)] DOI: 10.1134/S0006297918010029
3. Abdelaziz MH, Abdelwahab SF, Wan J, Cai W, Huixuan W, Jianjun C, Kumar KD, Vasudevan A, Sadek A, Su Z, Wang S, Xu H. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma. *Journal of Translational Medicine*. 2020;(18):58. DOI: 10.1186/s12967-020-02251-w
4. Gopallawa I, Dehinwal R, Bhatia V, Gujar V, Chirmule N. A four-part guide to lung immunology: Invasion, inflammation, immunity, and intervention. *Frontiers in Immunology*. 2023;(14):1119564. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1119564
5. Arora S, Deva K, Agarwal B, Dasc P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. 2018; (223): 383-96. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.11.001
6. van den Bosch WB, James AL, Tiddens HAWM. Structure and function of small airways in asthma patients revisited. *European Respiratory Review*. 2021; 30(159): 200186. DOI: 10.1183/16000617.0186-2020
7. Arora P, Ansari SH. Role of various mediators in inflammation of asthmatic airways. *Asthma - Biological Evidences*. *IntechOpen*; 2019. Accessed August 07, 2023. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84357>

8. Wang L, Yuan X, Li Z, Zhi F. The role of macrophage autophagy in asthma: A novel therapeutic strategy. *Mediators of Inflammation*. 2023;(2023):7529685. DOI: 10.1155/2023/7529685
9. Пирогов АВ, Приходько АГ, Пирогова НА, Перельман ЮМ. Клинические и патогенетические аспекты нейтрофильного воспаления бронхов у больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей (обзор литературы). *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(1):143-152. [Pirogov AV, Prikhodko AG, Pirogova NA, Perelman JM. Clinical and pathogenetic aspects of neutrophilic bronchial inflammation in asthma patients with cold-induced airway hyperresponsiveness (literature review). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(1):143-152. (In Russian)] DOI: 10.20538/1682-0363-2023-1-143-152
10. Guo Y, Cao W, Zhu Y. Immunoregulatory functions of the IL-12 family of cytokines in antiviral systems. *Viruses*. 2019;11(9):72. DOI: 10.3390/v11090772
11. Floss DM, Moll JM, Scheller J. IL-12 and IL-23-close relatives with structural homologies but distinct immunological functions. *Cells*. 2020;9(10):2184. DOI: 10.3390/cells9102184
12. Панасенко ОМ, Горудко ИВ, Соколов АВ. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах. *Успехи биологической химии*. 2013; (53): 195-244. [Panasencko OM, Gorudko IV, Sokolov AV. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2013;(53):195-244. (In Russian)] DOI: 10.1134/S0006297913130075
13. Frey A, Lunding LP, Ehlers JC, Weckmann M, Zissler UM, Wegmann M. More than just a barrier: The immune functions of the airway epithelium in asthma p *Frontiers in Immunology*. 2020;(11):761. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00761
14. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (2023 update). Accessed August 07, 2023. https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2023/07/GINA-2023-Full-report-23_07_06-WMS.pdf
15. Перельман ЮМ, Наумов Д.Е., Приходько АГ, Колосов ВП. Механизмы и проявления осмотической гиперреактивности дыхательных путей. Владивосток: *Дальнаука*; 2016. 240 с. [Perelman JM, Naumov DE, Prikhod'ko AG, Kolosov VP. Mechanisms and manifestations of osmotic airway hyperresponsiveness. Vladivostok: *Dal'nauka*; 2016. 240 p. (In Russian)].
16. Dragonieri S, Bikov A, Capuano A, Scarlata S, Carpagnano GE. Methodological aspects of induced sputum. *Advances in Respiratory Medicine*. 2023;91(5):397-406. DOI: 10.3390/arm91050031
17. Хейхоу ФГДж, Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. Москва: *Медицина*; 1983. 318 с. [Hauhoe FGJ, Quagliano D. Hematologic cytochemistry. M.: *Meditina*; 1983. 318 p. (In Russian)].
18. Frey A, Lunding LP, Ehlers JC, Weckmann M, Zissler UM, Wegmann M. More than just a barrier: The immune functions of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Frontiers in Immunology*. 2020;(11):761. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00761
19. Hertweck A, Vila de Mucha M, Barber PR, Dagil R, Porter H, Ramos A, Lord GM, Jenner RG. The TH1 cell lineage-determining transcription factor T-bet suppresses TH2 gene expression by redistributing GATA3 away from TH2 genes. *Nucleic Acids Research*. 2022;50(8):4557-4573. DOI: 10.1093/nar/gkac258
20. Calvén J, Ax E, Rådinger M. The airway epithelium – a central player in asthma pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(23):29.8907. DOI: 10.3390/ijms21238907
21. Bonser LR, Erle DJ. The airway epithelium in asthma. *Advances in Immunology*. 2019; (142):1-34. DOI: 10.1016/bs.ai.2019.05.001

Сведения об авторах

Пирогов Алексей Борисович, к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории профилактики неспецифических заболеваний легких, Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания; адрес: Российская Федерация, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 2; тел.: +7(4162)772801; e-mail: dncfpd@dncfpd.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5846-3276>

Приходько Анна Григорьевна, д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории функциональных методов исследования дыхательной системы, Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания; адрес: Российская Федерация, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22; тел.: +7(4162)772801; e-mail: prih-anya@ya.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2847-7380>

Перельман Юлий Михайлович, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией функциональных методов исследования дыхательной системы, Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания; адрес: Российская Федерация, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22; тел.: +7(962)2857017; e-mail: jperelman@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9411-7474>

Author information

Aleksey B. Pirogov, Cand. Med. Sci., Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory for Prophylaxis of Nonspecific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Physiology and

Pathology of Respiration; Address: 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, Russian Federation, 675000; Phone: +7(4162)772801; e-mail: dncfpd@dncfpd.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5846-3276>

Anna G. Prihodko, Dr.Med.Sci., Chief Researcher, Laboratory for Functional Research of Respiratory System, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; Address: 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, Russian Federation, 675000; Phone: +7(4162)772801; e-mail: prih-anya@ya.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2847-7380>

Juliy M. Perelman, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Dr.Med. Sci., Professor, Head of the Laboratory for Functional Research of Respiratory System Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; Address: 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, Russian Federation, 675000; Phone: +7(4162)772801; e-mail: jperelman@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9411-7474>

Дата поступления: 20.06.2023

Дата рецензирования: 30.11.2023

Принято к публикации: 16.01.2024

Received 20 June 2023

Revision Received 30 November 2023

Accepted 16 January 2024