

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.248:616-001.9:612.225]611-018.7

DOI: 10.12737/article_5b188b4bad3200.10559927

ИЗМЕНЕНИЯ БОКАЛОВИДНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ОТВЕТ НА ХОЛОДОВУЮ БРОНХОПРОВОКАЦИЮ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С ХОЛОДОВОЙ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬЮ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

А.Б.Пирогов¹, А.Г.Приходько¹, Ю.М.Перельман¹, С.В.Зиновьев², Сян Дун Чжоу³, Ци Ли³

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95

³Госпитальная клиника Хайнаньского медицинского университета, КНР, г. Хайкоу, просп. Лонгхуа, 31

РЕЗЮМЕ

Деструкция бронхиального эпителия у больных бронхиальной астмой (БА) лежит в основе механизма эпителиальной дисфункции, мукоцилиарной недостаточности и ремоделирования бронхов. Цель работы – оценить характер изменений, происходящих в структурной организации клеточных элементов и секреторной активности бронхиального бокаловидного эпителия у больных БА с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей (ХГДП) в ответ на холодовую бронхопровокацию. В исследовании приняли участие 28 больных лёгкой формой БА, которым в первый день исследования проводился сбор индуцированной мокроты, на следующий день выполнялась стандартная 3 минутная проба изокапнической гипервентиляцией холодным (-20°C) воздухом (ИГХВ), после чего осуществлялся повторный сбор мокроты. В цитограммах мокроты определяли процентное содержание, степень деструкции и интенсивности цитолиза клеточных элементов, изучалось содержание гликопротеинов в бокаловидных эпителиальных клетках (БК). В 1 группу вошли 14 больных с ХГДП, группу сравнения (2 группа) составили 14 больных БА не имевших реакции дыхательных путей на пробу ИГХВ ($\Delta\text{ОФВ}_1 = -19,9 \pm 1,6$ и $-2,8 \pm 1,3\%$; $p=0,00001$). После пробы ИГХВ в цито-

граммах мокроты больных с ХГДП наблюдалось увеличение числа нейтрофилов по отношению к базовому (с $39,9 \pm 2,8$ до $54,0 \pm 2,3\%$; $p=0,0004$, соответственно), уменьшение числа макрофагов (с $45,3 \pm 3,4$ до $31,4 \pm 2,6\%$; $p=0,005$) без изменений числа эозинофилов ($10,0 \pm 2,2$ и $10,4 \pm 1,6\%$; $p=0,14$) на фоне усиленного цитолиза ($2,4 \pm 0,16$ и $3,1 \pm 0,16\%$; $p=0,0007$). Наблюдалось снижение числа БК по отношению к исходному (с $0,22 \pm 0,02$ до $0,16 \pm 0,02\%$; $p=0,037$) без значимых различий числа эпителиальных клеток ($1,6 \pm 0,54$ и $1,5 \pm 1,20\%$; $p=0,97$). Суммарный индекс деструкции БК составил $0,45 \pm 0,02$ и $0,51 \pm 0,02$ ($p=0,045$); индекс интенсивности цитолиза БК – $0,20 \pm 0,04$ и $0,20 \pm 0,02$ ($p=0,27$). Обращает на себя внимание высокое число БК, сохранивших после холодовой бронхопровокации нормальную структуру (0 и 1 класс деструкции), увеличение по отношению к исходным значениям числа клеток II класса деструкции, при отсутствии изменений в III и IV классе деструкции. При цитохимической реакции количество окрашенных альциановым синим БК, активно синтезирующих и секретирующих гликопротеины в ответ на пробу ИГХВ, достоверно увеличивалось по отношению к базовому значению (с $59,8 \pm 3,3$ до $70,8 \pm 4,0\%$, $p=0,0002$, соответственно). Найдена тесная связь между усиленной продукцией БК гликопротеинов в ответ на бронхопровокацию

и выраженностью реакции бронхов ($\Delta\text{ОФВ}_1$) на пробу ИГХВ ($r=-0,37$; $p=0,029$). Таким образом, у больных БА с ХГДП кратковременное холодное воздействие влечёт за собой увеличение количества нейтрофилов, снижение числа БК при усиленной продукции в них гликопротеинов.

Ключевые слова: бронхиальная астма, холодовая гиперреактивность дыхательных путей, бокаловидные клетки, муцины.

SUMMARY

THE CHANGE OF GOBLET CELLS IN RESPONSE TO COLD BRONCHIAL CHALLENGE IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA WITH COLD AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS

A.B.Pirogov¹, A.G.Prikhodko¹, J.M.Perelman¹, S.V.Zinoviev², Xiangdong Zhou³, Qi Li³

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

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

³The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, 31 Longhua Road, Longhua District, Haikou, Hainan, China

Destruction of bronchial epithelium in patients with bronchial asthma (BA) is at the bottom of the mechanism of epithelial dysfunction, mucociliary insufficiency and bronchial remodeling. The aim of the work is to assess the character of changes that happen in the structural organization of cell elements and secretory activity of bronchial goblet epithelium in response to cold bronchial challenge in BA patients with cold airway hyperresponsiveness (CAHR). 28 patients with mild BA took part in the research. In the first day of the research the collection of the induced sputum was done, then the next day there was conducted a standard 3-minute test of isocapnic hyperventilation with cold (-20°C) air (ИГХВ), after that the collection of sputum was done again. In cytograms of the sputum the percentage, the degree of destruction and cytolysis intensity of cell elements was determined; the contents of glycoproteins in goblet epithelial cells (GS) was studied. The first group included 14 patients with CAHR, the group of comparison (the second group) included 14 patients with BA who did not have airway response to ИГХВ ($\Delta\text{FEV}_1=-19,9\pm 1,6$ and $-2,8\pm 1,3\%$, respectively, $p=0,00001$). After ИГХВ in cytograms of the sputum of the patients with CAHR there was an increase of the number of neutrophils in relation to the basic one (from $39,9\pm 2,8$ till $54,0\pm 2,3\%$, respectively, $p=0,0004$), the decrease of the number of macrophages (from $45,3\pm 3,4$ till $31,4\pm 2,6\%$, $p=0,005$) without the changes of the number of eosinophils ($10,0\pm 2,2$ and $10,4\pm 1,6\%$, $p=0,14$) against intensified cytolysis ($2,4\pm 0,16$ and $3,1\pm 0,16\%$, $p=0,0007$). There was a decrease of the number of GC in relation to the initial one (from $0,22\pm 0,02$ till $0,16\pm 0,02\%$; $p=0,037$) without significant changes of the number of epithelial cells ($1,6\pm 0,54$ and

$1,5\pm 1,20\%$; $p=0,97$). The total index of destruction of GC was $0,45\pm 0,02$ and $0,51\pm 0,02$ ($p=0,045$); the index of cytolysis intensiveness of GC was $0,20\pm 0,04$ and $0,20\pm 0,02$ ($p=0,27$). A high number of GC that had a normal structure (0 and 1 class of destruction) as well as an increase of the number of cells in relation to initial values of the number of cells of II class against the absence of changes of III and IV classes of destruction were quite noticeable. Under cytochemical reaction the number of alcian blue stained GC actively synthesizing and secreting glycoproteins in response to ИГХВ increased in relation to the basic value (from $59,8\pm 3,3$ till $70,8\pm 4,0\%$, $p=0,0002$, respectively). There was found a close correlation between the intensified production of GC glycoproteins in response to bronchial challenge and intensification of bronchial response (ΔFEV_1) to ИГХВ ($r=-0,37$; $p=0,029$). Thus, in the patients with BA and CAHR a short-term cold air exposure leads to the increase of the number of neutrophils and the decrease of the number of GC under intensive production of glycoproteins in them.

Key words: bronchial asthma, cold airway hyperresponsiveness, goblet cells, mucins.

Секреция муцинов MUC5AC и MUC5B (высокогликолизированных макромолекул, гликопротеинов с доминирующим углеводным компонентом), являющихся основными компонентами бронхиальной слизи, обеспечивает барьерную функцию и клиренс проксимальных и дистальных отделов воздухоносного тракта. Гиперпродукция муцинов бокаловидными клетками слизистой оболочки и экзокриноцитами желёз подслизистой основы дыхательных путей, регулируемая активацией генов муцинов под влиянием медиаторов воспалительного (иммунного) ответа, манифестирует развитие бронхолегочной патологии [9, 15]. У больных бронхиальной астмой (БА) продукция муцинов MUC5AC и MUC5B увеличивается, соответственно, в 40-200 и в 3-10 раз, одновременно повышается синтез муцинов MUC2, MUC6, MUC7, MUC8 [9, 14, 15]. Гиперсекреция муцинов нарастает по мере утяжеления течения БА, сопровождается нарушением циркуляции тканевой жидкости в бронхах, дегидратацией муцинового геля и повышением его вязкости за счёт увеличения уровня хондроитинсульфатов, снижения уровня гиалуроновой кислоты и гепарина в составе муцинов, более прочным связыванием геля с поверхностью эпителия [2, 9]. Комплексы муцины-сульфаты определяют сложную фибриллярную структуру и значительное утолщение слизистого слоя бронхов, обуславливают замедление скорости движения бронхиального секрета, нарушение мукоцилиарного клиренса (МЦК) и формирование мукоцилиарной недостаточности (МЦН) [2, 7, 9, 14].

В соответствии с представлением о включении в феномен обструкции дыхательных путей быстрой реакции – бронхоконстрикции и медленных реакций – воспалительной экссудации и гиперсекреции муцинов, в верхних дыхательных путях больных БА с холодной гиперреактивностью дыхательных путей (ХГДП) в

ответ на назальную изокапническую гипервентиляцию холодным воздухом увеличивается содержание гликопротеинов [5]. Установлено, что продолжительная гиперсекреция бронхиальных муцинов оказывает негативное влияние на функцию внешнего дыхания таких больных [5].

В исследованиях *in vitro* было показано, что в результате холодового воздействия на дыхательные пути резко возрастает продукция муцинов бокаловидными клетками покровного эпителия, в меньшей степени – экзокриноцитами желез трахеи и бронхов [8]. При длительном холодовом воздействии в дыхательных путях развивается комплекс специфических изменений мукополисахаридного обмена с преобладанием кислых гликозаминогликанов (ГАГ), индукцией воспаления, катаболических процессов, репаративного коллагенообразования, стромального фиброза и склероза [8].

Изучение роли гиперсекреции мукопротеидов, нейтральных полисахаридов и кислых ГАГ для механизмов развития гиперреактивности, МЦН и ремоделирования бронхов у больных БА следует рассматривать в комплексе с проблемой негативного влияния низких температур атмосферного воздуха Северо-Восточного региона, который способствует мофофункциональной перестройке органов дыхания, в том числе статуса мукоцитов воздухоносного тракта.

Целью настоящей работы явилось изучение характера изменений, происходящих в структурной организации клеточных элементов и секреторной активности бронхиального бокаловидного эпителия у больных БА с ХГДП в ответ на холодовую бронхопровокацию.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 28 больных лёгкой персистирующей формой БА согласно критериям GINA [13]. Дизайн работы предусматривал оценку симптомов БА с использованием валидизированного вопросника Asthma Control Test (ACT, Quality Metric Inc., 2002) за последние 4 недели до проведения обследования, исследование базовой функции внешнего дыхания при спирометрии (Easy on-PC, nddMedizintechnik AG, Швейцария) [6], после которого осуществлялся сбор индуцированной мокроты по стандартной методике [10], на следующий день сбор спонтанно продуцируемой мокроты проводился после выполнения 3-минутной пробы изокапнической гипервентиляцией холодным (-20°C) воздухом (ИГХВ).

По результатам реакции дыхательных путей на ИГХВ обследованные больные были распределены в группы: в 1 группу (14 человек) вошли пациенты с ХГДП, во 2 группу (14 человек) – пациенты с отрицательной реакцией на бронхопровокационную пробу ($\Delta\text{ОФВ}_1 = -14,6 \pm 2,0$ и $-2,8 \pm 1,3\%$, $p=0,000001$, соответственно). Пациенты были сопоставимы по основным антропометрическим параметрам (возраст $40,4 \pm 3,2$ и $39,8 \pm 2,7$ лет, $p=0,89$; рост $170,7 \pm 2,7$ и $167,9 \pm 2,4$ см, $p=0,46$, соответственно), функции внешнего дыхания ($\text{ОФВ}_1 = 93,2 \pm 5,0$ и $98,7 \pm 5,4\%$, $p=0,47$) и уровню контроля над заболеванием (ACT = $16,1 \pm 2,1$ и $19,1 \pm 2,0$ баллов, $p=0,32$).

Цитологическое исследование мокроты проводили не позднее 2 часов после её получения стандартным методом при помощи светооптической иммерсионной микроскопии. Подсчитанное количество клеток выражали в процентах. Степень деструкции и интенсивности цитолиза клеток бронхиального эпителия и бокаловидных эпителиальных клеток определяли по методу Л.А.Магвеевой [3]. Выделяли пять классов деструкции клеток в зависимости от изменений структурной целостности клеточных элементов: 0 – нормальная структура; I – частичное (не более 1/2) деструктивное повреждение цитоплазмы, нормальная структура ядра; II – значительная (более 1/2), но неполная деструкция цитоплазмы, частичное повреждение ядра; III – полная деструкция цитоплазмы, значительная деструкция ядра; IV – полная деструкция с распадом цитоплазмы и ядра.

Вычисляли суммарный индекс деструкции клеток (ИДК) и индекс интенсивности цитолиза клеток (ИЦ, как отношение наиболее разрушенных клеток к содержанию остальных поврежденных клеток): $\text{ИДК} = n_1 + n_2 + n_3 + n_4 / 100$; $\text{ИЦ} = n_4 / (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$, где 0, 1, 2, 3, 4 – номера классов деструкции; n_0, n_1, n_2, n_3, n_4 – количество клеток соответствующего класса.

Для изучения содержания гликопротеинов в бокаловидных эпителиальных клетках после фиксации препаратов в формалине использовали метод окраски цитологических мазков альциановым синим, селективно выявляющим муцины (гликопротеины, кислые ГАГ) в цитоплазме бокаловидных клеток [4]. Уровень содержания гликопротеинов (ГАГ) в бокаловидном эпителии оценивали по количеству окрашенных альциановым синим клеток, выраженному в процентах.

Статистический анализ полученного материала проводился на основе стандартных методов вариационной статистики. Для определения уровня статистической значимости различий использовали параметрический критерий (t) Стьюдента (парный, непарный), в случаях негауссовых распределений – непараметрический критерий Колмогорова-Смирнова. С целью определения степени связи между двумя случайными величинами проводили корреляционный анализ, рассчитывали коэффициент корреляции (r). Для всех величин принимался во внимание минимальный уровень значимости (p) 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В ответ на пробу ИГХВ в цитограммах мокроты больных обеих групп количество клеток десквамированного бронхиального эпителия характеризовалось тенденцией к увеличению. Так, у пациентов 1 группы исходное количество эпителиальных клеток составило $1,5 \pm 1,20\%$, после пробы ИГХВ – $1,6 \pm 0,54\%$ ($p=0,97$), у пациентов 2 группы $1,7 \pm 1,16$ и $2,4 \pm 0,89\%$ ($p=0,19$), соответственно. При этом, если число бокаловидных клеток в мокроте после холодовой бронхопровокации во 2 группе двукратно прирастало с $0,07 \pm 0,04$ до $0,14 \pm 0,04\%$ ($p=0,092$), то в 1 группе наблюдалось их снижение с $0,22 \pm 0,02$ до $0,16 \pm 0,02\%$ ($p=0,037$), что косвенно могло свидетельствовать о формирующейся у

них МЦН. Известно, что чем меньше бокаловидных клеток, продуцирующих жидкий секрет, насчитывается в структуре эпителия, тем более вероятно развитие в дыхательных путях нарушений эскалации бронхиального секрета во внешнюю среду [2].

В ответ на кратковременную бронхопровокацию холодным воздухом в обеих группах больных прослеживалась тенденция к увеличению цитологических показателей деструкции бокаловидных клеток бронхиального эпителия, представленная данными ИДК бокаловидных клеток (табл. 1, 2). Согласно значениям ИЦ,

базовый цитолиз бокаловидных клеток у больных 1 группы был более интенсивным, чем во 2 группе, однако после холодовой стимуляции уровень интенсивности цитолиза не изменялся, между тем как во 2 группе цитолитическая активность бокаловидных клеток достоверно увеличивалась (табл. 1, 2). Кроме того, у этих больных наблюдалась интенсификация деструктивно-цитолитических процессов бронхиального эпителия в ответ на пробу ИГХВ (табл. 2), тогда как в 1 группе показатели ИДК и ИЦ после провокации характеризовались лишь тенденцией к увеличению (табл. 1).

Таблица 1

Индексы деструкции клеток и интенсивности цитолиза (ИДК, ИЦ, усл. ед.), классы деструкции клеток (в %) в мокроте больных БА с ХГДП (M±m)

Показатель	Базовый	После пробы ИГХВ	Δ	p
Бронхиальный эпителий				
ИДК БЭ	0,43±0,03	0,48±0,02	0,04±0,04	0,29
ИЦ БЭ	0,20±0,02	0,22±0,01	0,02±0,02	0,52
n0	56,5±2,9	52,9±2,8	3,6±4,1	0,40
n1	15,0±2,1	17,1±1,8	2,1±2,0	0,39
n2	5,6±0,60	6,9±0,68	1,2±0,7	0,36
n3	4,0±0,54	4,4±0,42	0,4±0,24	0,14
n4	19,6±2,2	18,9±1,6	0,77±2,46	0,76
Бокаловидные клетки				
ИДК БК	0,45±0,02	0,51±0,02	0,07±0,02	0,045
ИЦ БК	0,20±0,04	0,20±0,02	0,004±0,04	0,27
n0	55,4±3,0	48,8±2,9	6,7±3,1	0,13
n1	15,4±2,2	17,9±1,8	2,5±2,5	0,34
n2	6,1±0,70	7,5±0,90	1,4±0,89	0,14
n3	4,3±0,47	5,0±0,61	0,67±0,47	0,18
n4	20,0±3,3	20,4±2,1	0,42±4,4	0,93

Примечание: здесь и в таблице 2: n0, n1, n2, n3, n4 – количество клеток 0, I, II, III, IV классов деструкции. БЭ – бронхиальный эпителий, БК – бокаловидные клетки; p – достоверность различий показателей в ответ на пробу ИГХВ.

Анализ дифференцировки бокаловидных клеток в мокроте по классам деструкции в группе больных с ХГДП в ответ на пробу ИГХВ показал незначительную тенденцию к повышению количества клеточных элементов, в различной мере разрушенных (I–III классы деструкции), при снижении числа клеток, сохранивших структурную целостность цитоплазмы и ядра (0 класс деструкции) (табл. 1, рис. 1–5). У этих же больных, в результате холодового воздействия также прослеживалась тенденция к снижению количества бронхиального эпителия нормальной структуры, увеличение числа повреждённых эпителиальных элементов I, II и III классов деструкции и незначительное

снижение числа полностью некротизированных эпителиоцитов IV класса деструкции.

Во 2 группе, после кратковременной холодовой бронхопровокации мы наблюдали увеличение числа частично разрушенного бронхиального и бокаловидного эпителия, со статистически значимой активизацией в отношении I и IV классов деструкции (табл. 2). В ответ на пробу ИГХВ отмечалось более значимое снижение количества бронхиальных эпителиоцитов и бокаловидных клеток 0 класса деструкции по сравнению с 1 группой (табл. 2).

Можно предположить, что у больных БА с ХГДП холодиндуцированная бронхоспастическая реакция,

активирующая деструкцию и цитолиз покровного эпителия с уменьшением содержания бокаловидных клеточных элементов, одновременно инициирует включение компенсаторных механизмов, препятствующих распаду ядра и некрозу бокаловидных клеток, тормозящих процесс тотальной деструкции IV класса и способствующих относительно стабильному уровню содержания клеток 0 класса. Бокаловидные клетки 0 класса деструкции, сохраняющие физиологическую

структуру ядра и цитоплазмы, относятся к нормально функционирующим мукоцитам, которые, согласно данным литературы, накапливают в апикальном полюсе цитоплазмы секрет, содержащий нейтральные мукополисахариды и ГАГ [8]. В результате мерокриновой секреции мукопротеины выделяются из бокаловидных клеток и равномерно распределяются в слизистом слое, покрывающем поверхность ресничек цилиарного эпителия бронхов [8].

Таблица 2

Индексы деструкции клеток и интенсивности цитолиза (ИДК, ИЦ, усл. ед.), классы деструкции клеток (в %) мокроты больных БА с отсутствием реакции дыхательных путей на холодовой стимул (M±m)

Показатель	Базовый	После пробы ИГХВ	Δ	p
Бронхиальный эпителий				
ИДК БЭ	0,45±0,02	0,53±0,02	0,08±0,02	0,001
ИЦ БЭ	0,16±0,02	0,18±0,01*	0,1±0,2	0,66
n0	56,4±1,9	48,6±2,8	7,9±2,3	0,004
n1	16,0±1,7	21,4±1,4*	5,4±1,5	0,003
n2	5,9±0,81	6,4±0,64	0,50±1,1	0,66
n3	4,9±0,16	5,1±0,07	0,14±0,14	0,34
n4	15,7±1,7	18,9±1,8	3,2±2,8	0,26
Бокаловидные клетки				
ИДК БК	0,38±0,02	0,47±0,03	0,9±0,02	0,002
ИЦ БК	0,14±0,02	0,20±0,02	0,05±0,03	0,096
n0	61,8±2,5	52,9±3,2	8,9±2,3	0,002
n1	12,6±1,1	15,7±1,3	3,1±1,4	0,045
n2	6,4±0,84	5,7±0,71	0,7±1,05	0,50
n3	4,5±0,82	4,3±0,48	0,21±0,72	0,77
n4	14,3±1,7	20,7±1,9	6,4±2,7	0,036

Примечание: * – достоверность различий показателя между 1 и 2 группами (p<0,05).

Обнаруженные после воздействия холодого триггера в дыхательных путях больных 1 группы бокаловидные клетки 0 класса деструкции в доле, близкой к исходной, могут быть охарактеризованы как клетки с мобилизованной синтетической и секреторной активностью, стимулированной оксидативным стрессом и адаптивно-приспособительной активацией нейтрофильного звена гранулоцитарного сегмента бронхиального воспаления.

Актуализация морфофункционального профиля нейтрофилов в воспалении, сопряженном с развитием реакции бронхов на холодовой стимул, может быть проиллюстрирована ростом уровня нейтрофилов в мокроте больных в ответ на пробу ИГХВ. У больных 1 группы количество нейтрофилов увеличилось с 39,9±2,8 до 54,0±2,3% (p=0,0004), у больных 2 группы

– с 40,6±2,8 до 53,1±2,3% (p=0,0004). При этом профиль эозинофилов в цитограммах мокроты пациентов как 1, так и 2 групп достоверно не изменялся, составив в среднем для 1 группы 10,0±2,2 и 10,4±1,6% (p=0,14), для 2 группы – 7,1±1,2 и 8,1±1,1% (p=0,32), соответственно, до и после пробы ИГХВ. На фоне этого происходило уменьшение числа макрофагов с 45,3±3,4 до 31,4±2,6% (p=0,005) в 1 группе, с 44,3±3,3 до 31,7±3,1% (p=0,0003) во 2 группе, на фоне усиления цитоза с 2,4±0,16 до 3,1±0,16% (p=0,0007) и с 2,1±0,12 до 2,5±0,12% (p=0,003), соответственно.

При цитохимической реакции на ГАГ и гликопротеины количество бокаловидных клеток, окрашенных альциановым синим, в мокроте больных увеличивалось после пробы ИГХВ: в 1 группе с 59,8±3,3 до 70,8±4,0% (p=0,0002), во 2 группе – с 50,6±3,3 до

61,1±2,7% (p=0,0002). Найденные межгрупповые различия данных показателей, характеризующих интенсивность генерации муцинов в бокаловидном эпителии как исходно, так и после пробы ИГХВ, позволяют прийти к следующему утверждению. Больные БА с ХГДП имеют более высокую базовую концентрацию гликопротеинов в покровном эпителии по отношению к больным, не имевшим реакции дыхательных путей на холодный воздух (p=0,07); при развитии бронхоспастической реакции содержание гликопротеинов у этих больных значительно прирастает, что даёт основание сделать вывод о холодиндуцированной эскалации секреторной муциновой активности бокаловидных клеток бронхиального эпителия.

В исследованиях *in vitro* структуры слизистой оболочки и гистохимической характеристики углеводных соединений воздухоносного тракта при длительном холодном воздействии установлено, что после разруше-

ния бронхиального эпителия в участки разрушения и в базальную мембрану внедряются мигрирующие из соединительной ткани тучные клетки [8]. Основным цитоплазматическим включением тучных клеток является кислый сульфатированный гликозаминогликан – гепарин, в соединении с белками гранул образующий протеогликан, подвергающийся экзоцитозу и принадлежащий к необходимым компонентам межклеточного вещества соединительной ткани дыхательной системы [1]. Тучные клетки являются активными продуцентами протеаз, гистамина, допамина, фактора агрегации тромбоцитов и стимуляции секреции гистамина (PAF), медленно реагирующей субстанции анафилаксии (SRS-A) и других цитокинов Th2 и Th1 типов, простагландинов, лейкотриенов, в частности, LTB₄, вызывающего агрегацию и дегрануляцию нейтрофилов, активацию лейкоцитов и миграцию нейтрофилов и эозинофилов в очаг воспаления [12, 16].

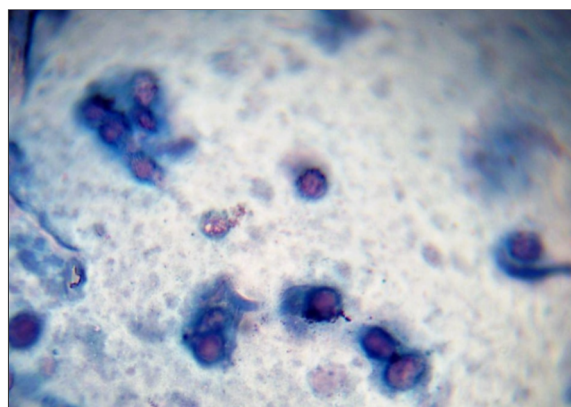


Рис. 1. Бокаловидные клетки I и II классов деструкции. Мазок мокроты больного БА с ХГДП после пробы ИГХВ. Окраска альциановым синим. Увеличение: 1250.

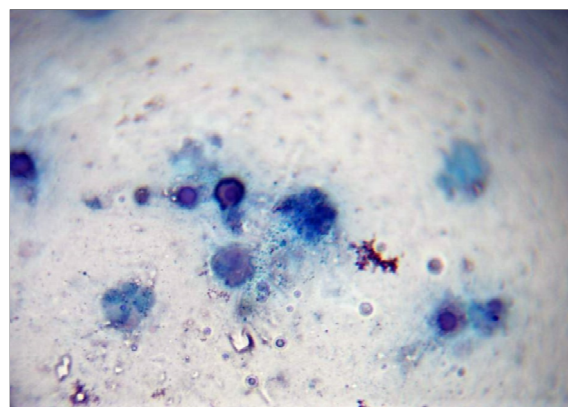


Рис. 2. В центре препарата разрушенные бокаловидные клетки IV класса деструкции, рядом дегранулирующая тучная клетка. По направлению к периферическим участкам бокаловидные клетки II–III классов деструкции. Мазок мокроты больного БА с ХГДП после пробы ИГХВ. Окраска альциановым синим. Увеличение: 1250.

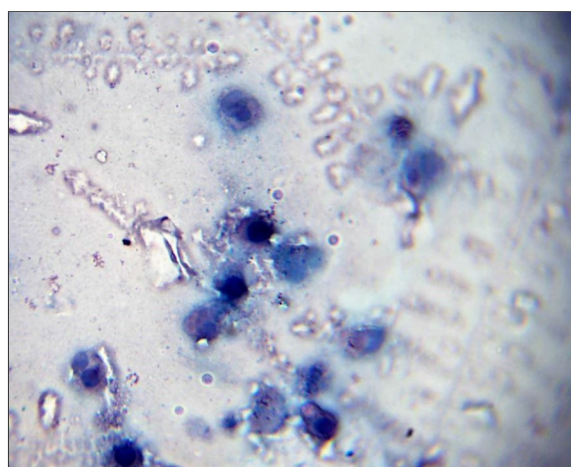


Рис. 3. Бокаловидные клетки I, II, III и IV классов деструкции. Мазок мокроты больного БА с ХГДП после пробы ИГХВ. Окраска альциановым синим. Увеличение: 1250.

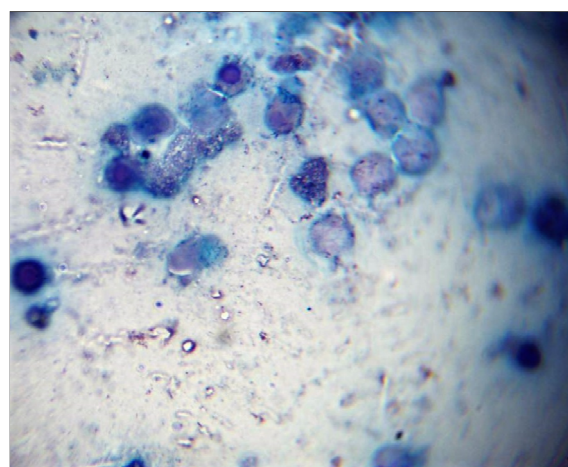


Рис. 4. Вверху среди бокаловидных клеток III–IV классов деструкции и по периферии препарата единичные клетки с частично поврежденным ядром (II класс деструкции). Мазок мокроты больного БА с ХГДП после пробы ИГХВ. Окраска альциановым синим. Увеличение: 1250.

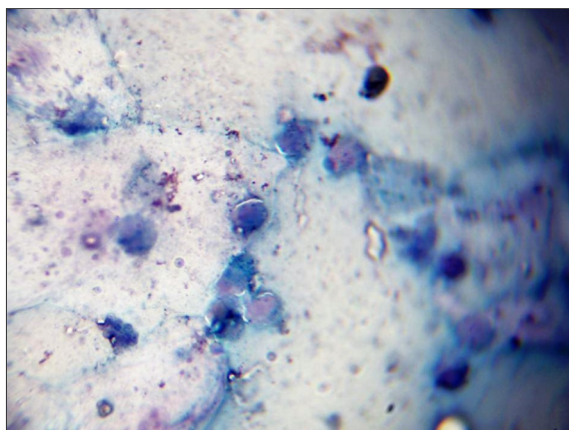


Рис. 5. Скопление бокаловидных клеток с полным разрушением цитоплазмы, значительным или полным распадом ядра (III–IV классы деструкции). Мазок мокроты больного БА с ХГДП после пробы ИГХВ. Окраска альциановым синим. Увеличение 1250.

Так как в мазках мокроты больных БА с ХГДП в ответ на пробу ИГХВ нередко выявлялись тучные клетки (рис. 2), можно высказать предположение о взаимосвязи между развитием ХГДП и стимулированной окислительным стрессом миграцией тучных клеток в их просвет. Вероятно, при чрезмерной реакции бронхов на кратковременную холодовую провокацию активность бронхиального тучноклеточного аппарата как короткодистантного регулятора тканевого гомеостаза интенсифицируется, что способствует повышению проницаемости сосудов микроциркуляторного русла, воспалительной экссудации и инфильтрации, функциональной активации лейомиоцитов, индуцирующих бронхоспазм.

Установлено, что в процессе повреждающего холодового воздействия и трансформации мерцательного эпителия в многослойный плоский базальная мембрана бронхов гиалинизируется, нейтральные полисахариды и кислые ГАГ накапливаются в поверхностных слоях эпителия и утолщенной базальной мембране, в рыхлой соединительной ткани и стенке кровеносных сосудов [8]. Базальный слой эпителия инфильтрируется эозинофилами и тучными клетками, на поверхности эпителия накапливается большое количество неравномерно распределенного вязкого секрета, имеющего ШИК-позитивную реакцию. Повышенная реакция на ГАГ сопровождается метахромазией, набуханием, фрагментацией и гомогенизацией коллагеновых волокон слизистой оболочки, что служит проявлением нарушений взаимоотношений между коллагеном и белково-углеводными комплексами, цементирующими вещество волокон [8]. В составе рыхлой соединительной ткани возрастает число малодифференцированных фибробластов и активно синтезирующих коллагенобластов, активирующихся увеличением ГАГ и ШИК-позитивных веществ и отображающих последовательное развитие гуморальных и клеточных фаз воспаления. Хроническое воспаление, фибриллогенез, фиброз и склероз стромы бронхов, индуцируемые накоплением ГАГ и мукопротеидов [8], лежат в

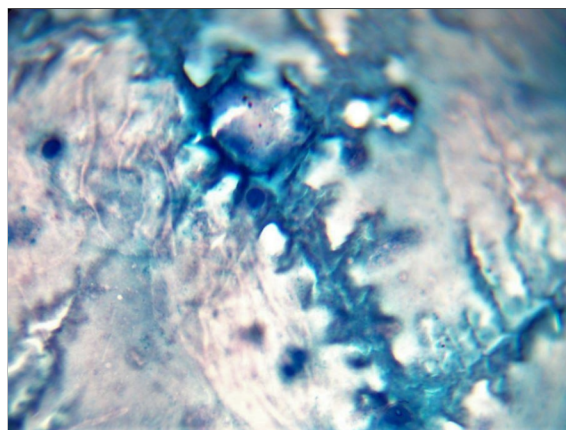


Рис. 6. Бокаловидные клетки и гранулярные лейкоциты среди большого количества слизи. Слизь с явлениями биокристаллизации. Мазок мокроты больного БА с ХГДП после пробы ИГХВ. Окраска альциановым синим. Увеличение: 1250.

структурной основе ремоделирования дыхательных путей, обусловленного их реакцией на многократное и продолжительное холодовое воздействие. Морфофункциональная перестройка слизистой оболочки бронхов в этом случае характеризуется как соответствующая стадии адаптивного напряжения, переходящего в стадию стабилизации [7,8].

В ультраструктурной картине мерцательного эпителия при длительном холодовом воздействии *in vitro*, сопровождающем пролиферативно-воспалительные и склеротические изменения бронхов, подчеркиваются выраженные деструктивные изменения ресничек и микроворсинок реснитчатых эпителиоцитов, дающих положительную реакцию на мукоид, и обилие слизистого секрета, содержащего большое количество ГАГ, микроорганизмов и наночастиц, на поверхности эпителиального пласта [7]. Утолщенный слизистый слой препятствует движению ресничек и снижает эффективность продвижения секрета в дыхательных путях. Морфологическим признакам мукоцилиарной дисфункции соответствуют полученные нами данные о структуре слизистого секрета в микропрепаратах индуцированной мокроты больных БА с синдромом ХГДП. Так, в мазках мокроты пациентов 1 группы можно было наблюдать «замурованность» клеток эпителия и полиморфноядерных лейкоцитов в обильный кристаллообразующий муциновый гель (рис. 6).

По мнению ряда авторов, нарушение механизма цилиарной синхронизации неизбежно влечет за собой снижение МЦК [9, 11], а деструкция эпителия, увеличивая проницаемость слизистой оболочки бронхов, обеспечивает развитие бронхиальной гиперреактивности [8]. О влиянии накопления гликопротеинов в эпителии бронхов на развитие ХГДП у больных БА можно судить по корреляционной зависимости между величиной реакции бронхов в ответ на пробу ИГХВ и обнаруженном в мокроте пациентов 1 группы после пробы количеством клеток бокаловидного эпителия, содержащим гликопротеины ($r=-0,47$; $p=0,041$). Из найденной корреляционной связи следует, что, чем выше концент-

рация гликопротеинов (ГАГ) в бокаловидном эпителии бронхов, тем более выраженной является реакция дыхательных путей на холодovou стимул. Кроме того, уровень контроля над заболеванием (АСТ) был тесно связан с количеством найденных в мокроте БК ($r=0,37$; $p=0,028$).

Таким образом, в результате реакции бронхов на холодovou стимул у больных БА с ХГДП усиливались признаки дезорганизации бронхиального эпителия, активировались деструкция и цитолиз бокаловидно-клеточного компонента, повышалась генерация муцинов бокаловидными клетками. У этих больных наблюдалось базовое накопление гликопротеинов в бокаловидном эпителии бронхов, превышающее аналогичные показатели у больных БА с отсутствием гиперреактивности дыхательных путей на пробу ИГХВ. Увеличение реакции дыхательных путей на острую холодovou бронхопровокацию сопровождалось повышением концентрации гликопротеинов в мокроте.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №17-54-53162 ГФЕН_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Красавина Н.П., Целуйко С.С., Доровских В.А. Тучные клетки органов дыхания и перспективы их изучения (обзор литературы) // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2004. Вып.19. С.74–79.
2. Луценко М.Т., Оди́реев А.Н., Перельман Ю.М., Шматок М.И. Этиопатогенез мукоцилиарной недостаточности при бронхиальной астме // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2014. Вып.54. С.30–37.
3. Матвеева Л.А. Местная защита респираторного тракта у детей. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1993. 276 с.
4. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике; в 2-х т. / под ред. А.И.Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. Т.1. 472 с.
5. Некрасов Э.В., Приходько А.Г., Перельман Ю.М. Секреторно-экссудативная реакция слизистой носа на воздействие холодного воздуха у больных бронхиальной астмой // Бюллетень сибирской медицины. 2017. Т.16, №2. С.146–158. doi: 10.20538/1682-0363-2017-2-146-158
6. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П. Гиперреактивность дыхательных путей. Владивосток: Дальнаука; 2011. 204 с.
7. Целуйко С.С. Ультраструктурная организация мукоцилиарного клиренса в норме и при холодovou воздействии // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2009. Вып.33. С.7–12.
8. Целуйко С.С., Красавина Н.П., Семенов Д.А., Чжоу С.Д., Ли С. Гистохимическая характеристика углеводных соединений в воздухоносном отделе легких крыс под действием холодного воздуха // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2012. Вып.46. С.69–76.
9. Чикина С.Ю., Белевский А.С. Мукоцилиарный

клиренс в норме и при патологии // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2012. №1. С.2–5.

10. Bakakos P., Schleich F., Alchanatis M., Louis R. Induced sputum in asthma: From bench to bedside // Curr. Med. Chem. 2011. Vol.18, №10. P.1415–1422. doi: 10.2174/092986711795328337

11. Braiman A., Priel Z. Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating // Respir. Physiol. Neurobiol. 2008. Vol.163, №1-3. P.202–207. doi: 10.1016/j.resp.2008.05.010

12. 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. P.10. doi:10.1186/1465-9921-12-10

13. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Updated 2017). URL: <http://www.ginasthma.com>.

14. Lu W., Lillehoj E.P., Kim K.C. Effects of dexamethasone on Muc5ac mucin production by primary airway goblet cells // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2005. Vol.288, №1. P.52–60. doi: 10.1152/ajplung.00104.2004

15. Rose M.C., Voynow J.A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease // Physiol. Rev. 2006. Vol.86, №1. P.245–278. doi: 10.1152/physrev.00010.2005

16. Theoharides T.C., Alysandratos K.D., Angelidou A., Delivanis D.A., Sismanopoulos N., Zhang B., Asadi S., Vasiadi M., Weng Z., Miniati A., Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol.1822, №1. P.21–33. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.12.014

REFERENCES

1. Krasavina N.P., Tseluiko S.S., Dorovskih V.A. Respiration mast cells (literature review). *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2004;19:74–79 (n Russian).
2. Lutsenko M.T., Odireev A.N., Perelman J.M., Shmatok M.I. Etiopathogenesis of mucociliary insufficiency in bronchial asthma. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2014; 54:30–37 (in Russian).
3. Matveeva L.A. Local protection of the respiratory tract in children. Tomsk; 1993 (in Russian).
4. Karpishchenko A.I., editor. Medical laboratory technologies. Moscow: GEOTAR-Media; 2012 (in Russian).
5. Nekrasov E.V., Prikhodko A.G., Perelman J.M. Secretion, exudation and oxidative stress in the nasal mucosa of asthma patients. *Bulletin of Siberian Medicine* 2017; 16(2):146–158 (in Russian). doi:10.20538/1682-0363-2017-2-146-158
6. Prikhodko A.G., Perelman J.M., Kolosov V.P. Airway hyperresponsiveness. Vladivostok: Dal'nauka; 2011 (in Russian).
7. Tseluyko S.S. Ultrastructural organization of mucociliary clearance in norm and under the cold influence *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2009; 33:7–12 (in Russian).
8. Tseluyko S.S., Krasavina N.P., Semenov D.A., Zhou X.D., Li Q. Histochemical characteristics of carbohydrate compounds in the airway of rats lungs under exposure to

cold. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2012; 46:69–76 (in Russian).

9. Chikina S. Yu., Belevskiy A.S. Mucociliary clearance in normal and pathological conditions. *Atmosfera. Pul'monologiya i allergologiya* 2012; (1):2–5 (in Russian).

10. Bakakos P., Schleich F., Alchanatis M., Louis R. Induced sputum in asthma: From bench to bedside. *Curr. Med. Chem.* 2011;18(10):1415–1422. doi:10.2174/092986711795328337

11. Braiman A., Priel Z. Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2008; 163(1-3):202–207. doi:10.1016/j.resp.2008.05.01

12. Bystrom J., Kawa A., Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic protein – a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir. Res.* 2011; 12(1):10. doi:10.1186/1465-9921-12-10

13. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Updated 2017). Available at: www.ginasthma.com.

14. Lu W., Lillehoj E.P., Kim K.C. Effects of dexamethasone on Muc5ac mucin production by primary airway goblet cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 288(1):52–60. doi:10.1152/ajplung.00104.2004

15. Rose M.C., Voynow J.A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol. Rev.* 2006; 86(1):245–278. doi:10.1152/physrev.00010.2005

16. Theoharides T.C., Alysandratos K.D., Angelidou A., Delivanis D.A., Sismanopoulos N., Zhang B., Asadi S., Vasiadi M., Weng Z., Miniati A., Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1822(1):21–33. doi: 10.1016/j.bbdis.2010.12.014

Поступила 25.04.2018

Контактная информация

Алексей Борисович Пирогов,

кандидат медицинских наук, доцент,

старший научный сотрудник лаборатории профилактики неспецифических заболеваний легких,

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,

675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: dncfpd@dncfpd.ru

Correspondence should be addressed to

Aleksey B. Pirogov,

MD, PhD, Associate professor, Senior staff scientist of Laboratory

of Prophylaxis of Non-Specific Lung Diseases,

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration,

22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: dncfpd@dncfpd.ru