

УДК 616.211-001.19:577.121.7:616.248

DOI 10.20538/1682-0363-2017-2-146-158

Для цитирования: 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; 16 (2): 146–158

Секреторно-экссудативная реакция слизистой носа на воздействие холодного воздуха у больных бронхиальной астмой

Некрасов Э.В., Приходько А.Г., Перельман Ю.М.

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания
Россия, 675000, Амурская обл., г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ

Введение. Сочетанная гиперреактивность дыхательных путей у больных бронхиальной астмой (БА) к холодовому и гипоосмотическому стимулам приводит к ухудшению функции внешнего дыхания и контроля над заболеванием по сравнению с больными с изолированной гиперреактивностью к одному из стимулов или ее отсутствием, что может быть связано с отеком и гиперсекрецией слизи.

Цель исследования. Оценка процессов секреции муцинов, экссудации плазмы и окислительного стресса в ответ на дыхание холодным воздухом у больных БА с сочетанной холодовой и гипоосмотической реактивностью дыхательных путей на примере слизистой носа.

Материал и методы. Назальный лаваж брали у 23 больных БА до и после (1 мин, 15 и 30 мин) пробы с 5-минутной гипервентиляцией холодным воздухом через нос. Секрецию слизистой носа оценивали по содержанию общего белка (ОБ), общих углеводов (ОУ) и муцинов (MUC5AC и MUC5B), экссудацию – по уровню α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ), окислительный стресс – по образованию реагирующих с тиобарбитуровой кислотой веществ (ТБКРВ) в лаважной жидкости.

Результаты. По результатам бронхопровокационных проб с изокапнической гипервентиляцией холодным воздухом (ИГХВ) и ингаляцией дистиллированной водой (ИДВ) больные были разделены на три группы: 1 – без реакции на ИГХВ или ИДВ ($n = 6$), 2 – с сочетанной гиперреактивностью дыхательных путей на оба стимула (падение $\Delta\text{ОФВ}_1$ на 10% и более) ($n = 11$), 3 – с изолированной гиперреактивностью дыхательных путей на один из этих стимулов ($n = 6$). В общей группе больных средние уровни ОБ, ОУ, α_2 -МГ и ТБКРВ увеличивались в лаважной жидкости после пробы с холодным воздухом на 63%, 109, 47 и 68% соответственно, тогда как содержание MUC5AC и MUC5B снижалось на 15 и 20% соответственно. Секреция и экссудация слизистой носа были более выраженными у больных группы 2 по сравнению с другими группами. Окислительный стресс был менее выражен у больных группы 1. Среди обнаруженных корреляций между реакциями бронхов на ИГХВ/ИДВ и изменениями в содержании биомаркеров в лаважной жидкости после пробы с холодным воздухом наибольший интерес представляют две: 1) между $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ИГХВ и содержанием ОУ на 15 мин ($r = -0,65$; $p = 0,0401$) и 30 мин ($r = -0,82$; $p = 0,0034$) восстановительного периода; 2) между $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ИДВ и изменением α_2 -МГ на 1 мин после пробы ($r = -0,67$; $p = 0,0242$).

Заключение. В соответствии с моделью единого респираторного тракта обнаруженные корреляции могут указывать на отрицательные последствия пролонгированной секреции муцинов для реакции бронхов на холодовой стимул и усиленную экссудацию плазмы в слизистой как фактор гипоосмотической реактивности дыхательных путей. Слизистая носа является перспективной моделью для исследования

✉ Перельман Юлий Михайлович, e-mail: jperelman@mail.ru.

молекулярных основ процессов секреции, экссудации и окислительного стресса в дыхательных путях у больных БА.

Ключевые слова: астма, слизистая носа, секреция, экссудация, окислительный стресс, дыхание холодным воздухом.

ВВЕДЕНИЕ

Климатические условия – низкая температура и влажность вдыхаемого воздуха – определяют сезонность обострения заболевания у больных бронхиальной астмой (БА), страдающих, соответственно, холодовой и осмотической гиперреактивностью дыхательных путей. На примере более 300 больных БА показано, что изолированная холодовая гиперреактивность дыхательных путей существенно превышает изолированную гиперреактивность на гипоосмотический стимул (31% против 17%), однако наибольшую долю (34%) в исследованной популяции составляют больные с сочетанной гиперреактивностью на оба стимула – холодовой и гипоосмотический [1]. Необходимость совместного исследования холодовой и осмотической гиперреактивностей дыхательных путей продиктована их превалированием среди больных БА в условиях континентального климата, а также сходством потенциальных механизмов действия этих двух триггеров, опосредованных ионными каналами с транзиторным рецепторным потенциалом семейства TRP [2, 3]. Потеря влаги дыхательными путями и повышение осмолярности также могут обуславливать реакции дыхательных путей на холодный воздух [4].

Обструкция дыхательных путей включает быструю реакцию бронхоконстрикции и медленные реакции – отек слизистой и гиперсекрецию муцинов [5]. Муцины представляют собой гигантские молекулы гликопротеинов, в которых углеводная часть доминирует над белковой частью. В дыхательных путях человека обнаружена экспрессия нескольких муцинов, среди которых главными гель-формирующими муцинами являются MUC5AC и MUC5B [6]. Гиперсекреция муцинов сопровождает многие заболевания дыхательных путей, в том числе и БА [6]. Специфичным показателем формирования отека и воспаления тканей рассматривают экссудацию плазмы, которая, в отличие от секреции муцинов, не находится под контролем нервных рефлексов в ответ на раздражители [7]. Повышенная проницаемость кровеносных сосудов и проникновение из кровяного русла альбумина и провоспалительных медиаторов были связаны с ранними проявлениями ухудшения контроля астмы [8].

Ранее мы сообщали о секреции муцинов слизистой носа у больных БА в ответ на гипервентиляцию холодным воздухом [9]. Использование слизистой носа представляется нам перспективной моделью для изучения реакций дыхательных путей на различные стимулы благодаря доступности, лучшей контролируемости при проведении процедуры отбора лаважной жидкости по сравнению с нижними дыхательными путями, меньшим дискомфортом для пациента и существенно меньшей опасностью бронхоспазма при проведении пробы. Несмотря на очевидные отличия слизистой носа от слизистой нижних дыхательных путей, респираторный тракт рассматривается как единая морфофункциональная система [10]. Слизистая носа уже была использована в качестве модели для исследований процессов секреции и экссудации в дыхательной системе в целом [11], а эпителиальные клетки носовой полости были предложены для исследования воспаления нижних дыхательных путей *in vitro* [12]. Холодный воздух является сильным стимулом, чтобы вызвать реакцию слизистой носа, и проявляющим эффект как благодаря низкой температуре, так и гиперосмолярности [4, 13].

Цель настоящей работы состояла в установлении вклада медленных реакций – гиперсекреции и отека, а также окислительного стресса в развитие реактивности дыхательных путей и ухудшение контроля болезни у больных БА с сочетанной гиперреактивностью на холодовой и осмотический стимулы, используя слизистую носа в качестве модели. Для этого анализировали биомаркеры секреции муцинов, экссудации плазмы и окислительного стресса до и после дыхания холодным воздухом и сравнивали группы больных с различной реакцией дыхательных путей на холодовой и гипоосмотический стимулы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 23 больных БА легкой и умеренной степени тяжести в возрасте 21–62 лет (средний возраст $(40,6 \pm 10,4)$ лет), восемь мужчин и 15 женщин. Холодовую и осмотическую гиперреактивность дыхательных путей больных БА определяли в ходе изокапнической гипервентиляции холодным воздухом

(ИГХВ) и ингаляции дистиллированной водой (ИДВ) [1]. Пробу ИГХВ проводили путем гипервентиляции в течение 3 мин охлажденной до -20°C воздушной смесью, содержащей 5% CO_2 . Пробу с ИДВ проводили с использованием ультразвукового ингалятора Thomex L-2 (Польша). Исследование включало две последовательные ингаляции (1 – 30 мл 0,9%-го раствора NaCl, 2 – 30 мл дистиллированной воды при температуре $37,3^{\circ}\text{C}$) длительностью 3 мин каждая. Для каждой пробы вентиляционную функцию легких тестировали перед началом бронхопровокации и после нее на 1- и 5-й мин восстановительного периода. Проба считалась положительной при падении объема форсированного выдоха за 1 с ($\Delta\text{ФВ}_1$) на 10% и более от базовой величины.

Отбор назальной лаважной жидкости и пробу с гипервентиляцией холодным воздухом через нос выполняли по процедуре [9]. Пациент вдыхал холодный воздух в режиме гипервентиляции через нос с использованием детской анестезиологической маски и выдыхал через рот в течение 5 мин. Всем пациентам выполняли забор лаважной жидкости из носовой полости до (контроль) и через 1 мин, 15 и 30 мин после проведения холодовой провокации. Перед первичным забором лаважной жидкости носовой проход промывали не менее трех раз 0,9%-м раствором NaCl при температуре $(36 \pm 3)^{\circ}\text{C}$. Назальный лаваж проводили с использованием шприца со специальной силиконовой насадкой. Для этого носовую полость заполняли 3 или 5 мл 0,9%-го раствора NaCl, выдерживали его в течение 1 мин, после чего отбирали обратно в шприц и переносили в мерную стеклянную пробирку для измерения объема извлеченной жидкости. С целью минимизации потерь лаважной жидкости вводимый в носовую полость объем 0,9%-го NaCl (3 или 5 мл) определяли в ходе предварительной промывки носового прохода. Собранную лаважную жидкость интенсивно перемешивали и отбирали 0,5 мл в другую пробирку для последующего анализа реагирующих с тиобарбитуровой кислотой веществ (ТБКРВ). Оставшуюся часть жидкости центрифугировали при 2 900 об/мин в течение 15 мин, отбирали аликвоты супернатанта для анализа биомаркеров и хранения. Образцы замораживали и хранили при температуре -20°C .

Общие углеводы (ОУ) анализировали фенол-серным методом по адаптированной процедуре [14], используя лактозу для построения калибровочной кривой. Общий белок (ОБ) определяли микрометодом Брэдфорд [15], используя 100 мкл лаважной жидкости и человеческий сы-

вороточный альбумин для построения калибровочной кривой. Содержание ТБКРВ определяли по методу [16]. Содержание ТБКРВ выражали в эквивалентном содержании малонового диальдегида (МДА). Содержание муцинов MUC5AC и MUC5B определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов CSB-E10109h и CSB-E11201h (Cusabio Biotech Co. Ltd., КНР), а также SEA756Hu и SEA684Hu (Cloud-Clone Corp., США). Содержание α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора α_2 -Macroglobulin ELISA Kit (Immundiagnostik AG, Германия). Поскольку при проведении назального лаважа пациентам вводили разный объем 0,9%-го NaCl (3 или 5 мл), общее содержание биомаркеров в лаважной жидкости рассчитывали как произведение концентрации компонента и объема извлеченной жидкости.

Статистический анализ (Statistica 8.0; Microsoft Office Excel 2003) выполняли на основе стандартных методов вариационной статистики. Для определения уровня статистической значимости различий использовали парный и непарный критерий *t* Стьюдента, в случаях негауссовых распределений – непараметрические критерии Колмогорова – Смирнова и Уилкоксона. С целью определения степени связи между двумя случайными величинами проводили корреляционный анализ, рассчитывали коэффициент корреляции (*r*). В работе использованы следующие обозначения: *M* – среднее, *m* – ошибка среднего, *n* – число пациентов в группе; принимали во внимание уровни значимости (*p*) 0,05; 0,01; 0,001.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам бронхопровокационных проб больные БА были разделены на группы: (табл. 1) группа 1 – без реакции на холодовой стимул или ингаляцию дистиллированной водой (*n* = 6), группа 2 – сочетанная гиперреактивность дыхательных путей на оба стимула (ИГХВ и ИДВ) (*n* = 11), группа 3 – изолированная гиперреактивность дыхательных путей на один из этих двух стимулов (*n* = 6). Пациенты с изолированной гиперреактивностью на один из двух стимулов были объединены в одну группу из-за малого числа таких пациентов, а также близких клинических характеристик и значений параметров функции внешнего дыхания в данных популяциях, как показано ранее [1].

В целом пациенты хорошо переносили процедуру пробы с холодным воздухом и сбор назальной лаважной жидкости. Десять пациентов сообщали об отсутствии каких-либо негативных

симптомов в процессе дыхания холодным воздухом через нос или после пробы. Остальные пациенты среди негативных симптомов называли заложенность носа ($n = 4$), тяжелое дыхание

($n = 1$), кашель и раздражение горла ($n = 6$), чувство раздражения в носу ($n = 5$). Объем извлеченной лаважной жидкости существенно не различался между группами больных (см. табл. 1).

Таблица 1

Параметры вентиляционной функции легких и реакция бронхов в ответ на ИГХВ и ИДВ по группам больных БА, $M \pm m$				
Показатель	Группа 1 ($n = 6$)	Группа 2 ($n = 11$)	Группа 3 ($n = 6$)	p
ОФВ ₁ , л	3,1 ± 0,39	2,8 ± 0,22	3,2 ± 0,12	$p_{1-2} = 0,364$ $p_{1-3} = 0,735$ $p_{2-3} = 0,134$
ОФВ ₁ , % долж.	91,8 ± 3,6	91,8 ± 3,6	102,1 ± 4,0	$p_{1-2} = 0,442$ $p_{1-3} = 0,086$ $p_{2-3} = 0,054$
ОФВ ₁ /ЖЕЛ, % долж.	95,8 ± 1,6	95,8 ± 1,6	96,4 ± 1,6	$p_{1-2} = 0,061$ $p_{1-3} = 0,796$ $p_{2-3} = 0,049$
ΔОФВ ₁ после ИГХВ, %	0,26 ± 1,56	-21,86 ± 4,70	-14,00 ± 6,19	$p_{1-2} = 0,003$ $p_{1-3} = 0,0495$ $p_{2-3} = 0,327$
ΔОФВ ₁ после ИДВ, %	-1,91 ± 2,06	-20,00 ± 3,94	-5,17 ± 2,39	$p_{1-2} = 0,006$ $p_{1-3} = 0,326$ $p_{2-3} = 0,0195$
Объем лаважной жидкости, мл:				Диапазон для четырех точек:
контроль	4,4 ± 0,2	4,1 ± 0,3	3,9 ± 0,3	$p_{1-2} = 0,64-0,83$
1 мин	4,1 ± 0,2	3,8 ± 0,3	4,0 ± 0,1	$p_{1-3} = 0,60-0,87$
15 мин	4,3 ± 0,3	3,9 ± 0,3	4,1 ± 0,3	$p_{2-3} = 0,40-0,91$
30 мин	4,3 ± 0,2	4,0 ± 0,4	4,3 ± 0,3	

Примечание. ЖЕЛ – жизненная емкость легких.

Для оценки секреции и экссудации плазмы слизистой носа в ответ на дыхание холодным воздухом определяли несколько параметров в назальной лаважной жидкости: общий белок (ОБ), общие углеводы (ОУ) и α_2 -макроглобулин (α_2 -МГ) до пробы (контроль) и через 1 мин, 15 и 30 мин после пробы, индивидуальные муцины (MUC5AC и MUC5B) до (контроль) и на 1-й мин после пробы. Крупные конгломераты муцинов в лаважной жидкости осаждали центрифуги-

рованием, поэтому только растворимые формы муцинов присутствовали в анализируемой надосадочной жидкости. В результате наборы для ИФА в большинстве случаев дали результаты для MUC5AC и MUC5B ниже предела их количественного определения. Поэтому концентрацию этих муцинов выражали в единицах оптической плотности (ОП_{450 нм}), а полученные величины их содержания носят только сравнительный характер (табл. 2).

Таблица 2

Содержание маркеров секреции, экссудации и окислительного стресса в назальной лаважной жидкости в ответ на провокацию холодным воздухом в общей группе больных ($n = 23$), $M \pm m$						
Показатель	ОБ, мкг	ОУ, мкг	α_2 -МГ, мкг	ТБКРВ, мкмоль	MUC5AC, у.е.	MUC5B, у.е.
Контроль	190,6 ± 25,5	33,4 ± 4,0	1,33 ± 0,39	0,95 ± 0,17	9,68 ± 1,21	7,28 ± 0,83
1 мин	311,5 ± 39,8***	69,9 ± 14,0***	1,96 ± 0,39	1,60 ± 0,28§§§	8,19 ± 1,15*	5,79 ± 0,67**
15 мин	270,6 ± 34,8	53,8 ± 8,0***	1,02 ± 0,27	1,37 ± 0,20§§	–	–
30 мин	310,7 ± 39,3§	51,1 ± 8,4**	1,25 ± 0,33	1,49 ± 0,21§§	–	–
Корреляции (r) по ОБ	–	0,603 $p < 0,001$	0,582 $p < 0,001$	0,470 $p < 0,001$	–	–
Корреляции (r) по ОУ	0,603 $p < 0,001$	–	0,276 $p < 0,05$	0,228 $p < 0,05$	–	–

Примечание. У.е. – условные единицы, рассчитанные как произведение ОП_{450 нм} и объема лаважной жидкости. § и * – уровни значимости различий после пробы с холодным воздухом по сравнению с контролем, рассчитанные по парному t-критерию Стьюдента (§) или критерию Уилкоксона (*): § и * – $p < 0,05$; §§ и ** – $p < 0,01$; §§§ и *** – $p < 0,001$.

Изменения в содержании ОБ отражают как секрецию муцинов, так и экссудацию плазмы. Содержание ОУ показывает общую секрецию муцинов, однако экссудация плазмы может также вносить свой вклад в этот показатель, поскольку многие белки плазмы гликозилированы, а кроме того, глюкоза плазмы может присутствовать в назальных секретах, если содержание сахара в крови превышает определенный порог слизистой для глюкозы [17]. Более специфичными биомаркерами процессов секреции и экссудации являются индивидуальные муцины MUC5AC и MUC5B для секреции и компонент плазмы α_2 -МГ для экссудации. Корреляционный анализ обнаружил взаимосвязи между уровнями ОБ и ОУ, с одной стороны, и ОБ и α_2 -МГ, с другой (см. табл. 2). Напротив, содержание ОУ было слабо связано с содержанием как α_2 -МГ, так и ТБКРВ. Это свидетельствует о том, что динамика содержания ОБ отражает как секрецию слизистой муцинов, так и экссудацию слизистой плазмы, тогда как уровни ОУ и α_2 -МГ являются преимущественно показателями секреции и экссудации соответственно.

В общей группе больных уровни ОБ, ОУ и α_2 -МГ в среднем увеличивались после пробы с холодным воздухом, тогда как уровни MUC5AC и MUC5B снижались. Увеличение α_2 -МГ не было статистически достоверным. В течение 30 мин после пробы ОБ оставался на высоком уровне, а содержание ОУ постепенно снижалось, хотя и не достигало исходного уровня через 30 мин. Среднее содержание α_2 -МГ снижалось на 15 мин после пробы и приближалось к исходному уровню к 30-й мин восстановительного периода. Изменение содержания ОУ в назальной жидкости сразу после пробы коррелировало с ОФВ₁ в общей группе больных БА: $r = 0,64$ ($p = 0,0008$).

Исходный уровень ОБ, а также уровень α_2 -МГ в назальной жидкости сразу после холодовой пробы имели отрицательные корреляции с Δ ОФВ₁ в ответ на ИДВ: $r = -0,60$ ($p = 0,0035$) и $r = -0,51$ ($p = 0,0147$) соответственно.

Различия между группами пациентов статистически недостоверны из-за высокой степени варьирования содержания биомаркеров между пациентами. Среднее содержание ОУ в группе 1 (без реактивности к холодному воздуху и дистиллированной воде) сразу после пробы с холодным воздухом было выше, чем в других группах. Однако в отличие от двух других групп это увеличение статистически недостоверно по сравнению с исходным уровнем до пробы (рис. 1, а). Так же как в общей группе больных, в группе 2 (сочетанная гиперреактивность к холодному воздуху и дистиллированной воде) выявлена положительная корреляция между ОФВ₁ и изменением содержания ОУ в назальной жидкости сразу после пробы с холодным воздухом ($r = 0,76$; $p = 0,0061$). В группе 2 обнаружена отрицательная корреляция между Δ ОФВ₁ в ответ на ИГХВ и содержанием ОУ на 15-й мин ($r = -0,65$; $p = 0,0401$) и 30-й мин ($r = -0,82$; $p = 0,0034$) восстановительного периода. В двух других группах подобных корреляций не обнаружено.

Повышенную величину среднего содержания ОУ в группе 1 сразу после пробы обеспечивали результаты для одного больного с необычно высоким уровнем углеводов на 1-й мин (см. рис. 1, а). Когда результаты для этого больного были исключены, среднее значение для группы 1 в этой точке стало ниже, чем для группы 2 и сходно с группой 3 (см. рис. 1, б). Более того, увеличение ОУ в группе 1 после пробы стало статистически достоверным по сравнению с исходным уровнем (см. рис. 1, б).

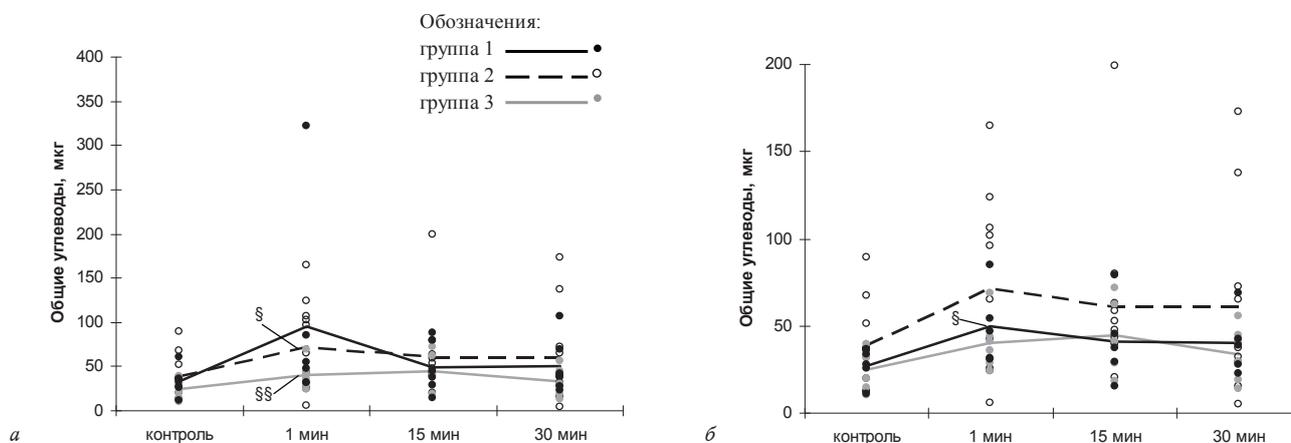


Рис. 1. Содержание общих углеводов в лаважной жидкости по группам больных до и после пробы с холодным воздухом (а) и то же самое за исключением одного больного из группы 1 с крайне высоким значением ОУ (б): линии – средние изменения по группам; маркеры – значения для индивидуальных пациентов; § – $p < 0,05$; §§ – $p < 0,01$ (увеличение показателя в группе на 1-й мин после пробы по сравнению с контролем)

Наибольшие средние значения ОБ отмечены в группе 2 (рис. 2). $\Delta\text{ОФВ}_1$ в группе 2 умеренно коррелировал с изменениями содержания ОБ после пробы ($r = 0,62$; $p = 0,041$). У больных группы 3 $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ИДВ имели отрицательную корреляцию с изменениями ОБ сразу после холодной пробы ($r = -0,89$; $p = 0,0191$), в то время как $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ИГХВ положительно коррелировала с этой величиной ($r = 0,82$; $p = 0,0447$).

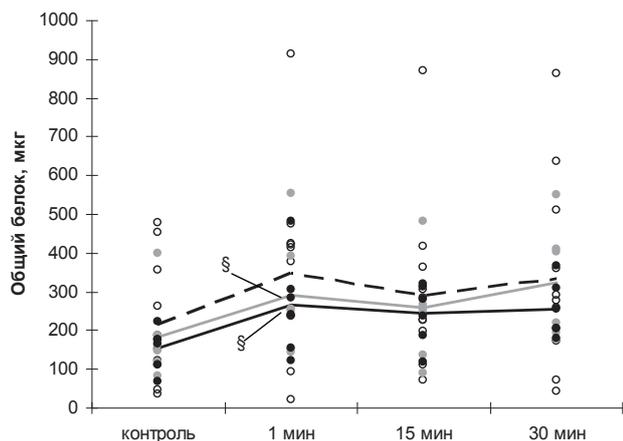


Рис. 2. Содержание общего белка в лаважной жидкости по группам больных до и после пробы с холодным воздухом. Для обозначений см. рис. 1

Изменения концентраций индивидуальных муцинов MUC5AC и MUC5B после дыхания холодным воздухом не связаны с изменениями содержания ОУ за несколькими исключениями: из 23 человек, включенных в группы, только 7 пациентов имели более высокую концентрацию MUC5AC и 5 – муцина MUC5B после пробы. Такие пациенты преимущественно принадлежали к группе 2 (рис. 3). У всех остальных пациентов концентрация муцинов снижалась или не изменялась после дыхания холодным воздухом. В среднем для группы 2 отмечено наименьшее снижение обоих муцинов: 3,8 и 5,8% от исходного уровня для MUC5AC и MUC5B соответственно. Наибольшее снижение наблюдали в группе 1 для концентрации MUC5AC (25,3%) и в группе 3 для MUC5B (21,6%) (рис. 3).

Среднее содержание α_2 -МГ в назальной лаважной жидкости было ниже в группе 1 до и после пробы по сравнению с группой 2, увеличивалось на 1-й мин после пробы в обеих группах, затем снижалось к 15-й мин и мало изменялось до 30-й мин (рис. 4). Обнаружено статистически недостоверное увеличение уровня α_2 -МГ сразу после ИГХВ в обеих группах. Среднее содержание α_2 -МГ для группы 3 изменялось мало в течение 30 мин после пробы с холодным воздухом (рис. 4).

У больных группы 2 величина $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ИДВ имела умеренную отрицательную связь с изменением уровня α_2 -МГ в лаважной жидкости сразу после холодной пробы по сравнению с начальным уровнем: $r = -0,67$; $p = 0,0242$.

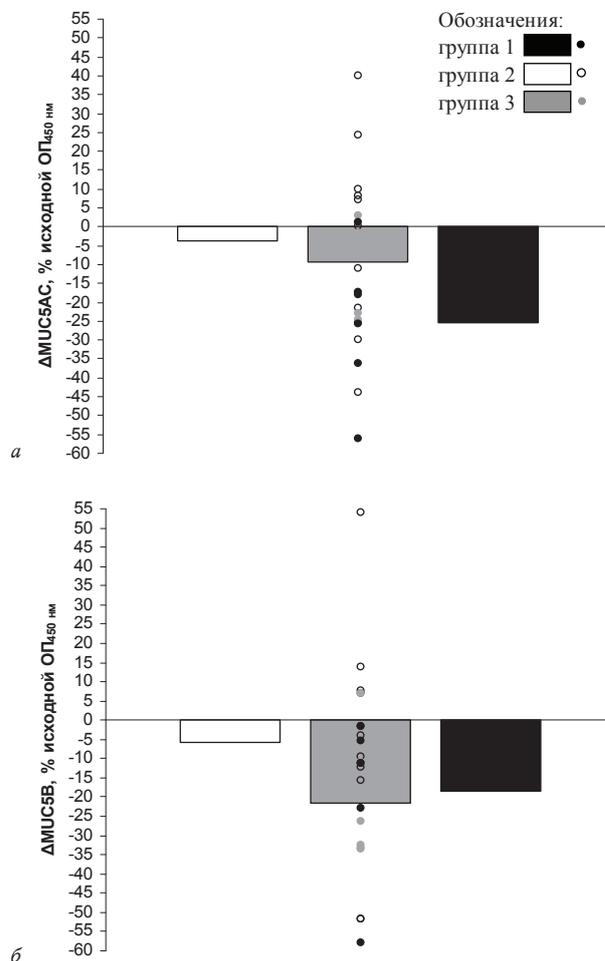


Рис. 3. Изменение содержания MUC5AC (а) и MUC5B (б) по группам больных до и после пробы с холодным воздухом: гистограммы изображают средние изменения по группе, маркеры – изменения для индивидуальных пациентов

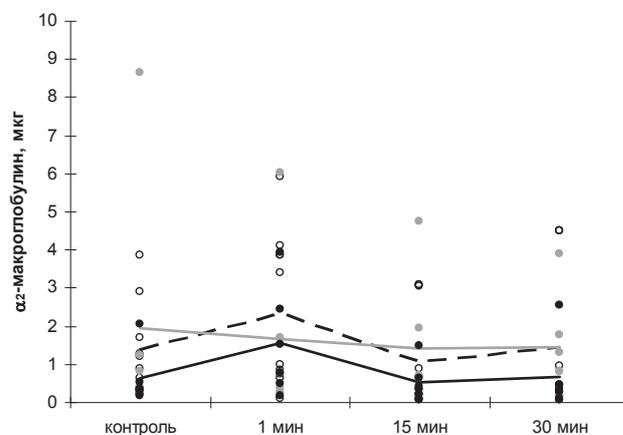


Рис. 4. Содержание α_2 -МГ в лаважной жидкости по группам больных до и после пробы с холодным воздухом. Для обозначений см. рис. 1

Увеличение содержания ТБКРВ в лаважной жидкости после холодовой пробы – общая тенденция для всей совокупности пациентов. При этом уровень ТБКРВ в общей группе был достоверно выше как сразу после дыхания холодным воздухом, так и на 15- и 30-й мин восстановительного периода по сравнению с исходным уровнем (см. табл. 2). Для групп больных изменения среднего содержания ТБКРВ характеризовались увеличением сразу после пробы и небольшим последующим снижением в группах 1 и 2 или увеличением в группе 3. Статистически достоверное увеличение ТБКРВ после пробы с холодным воздухом отмечено только в группе 2 (рис. 5).

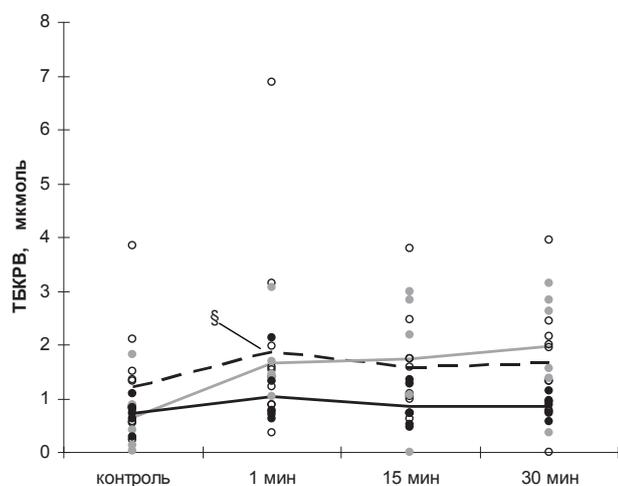


Рис. 5. Содержание ТБКРВ в лаважной жидкости по группам больных до и после пробы с холодным воздухом. Для обозначений см. рис. 1

ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя БА рассматривается как заболевание нижних дыхательных путей, многие наблюдения свидетельствуют, что верхние дыхательные пути также вовлечены в развитие заболевания, тем самым подтверждая модель единого респираторного тракта [10]. Риниты и хронические риносинуситы тесно связаны с БА, как показано на основе эпидемиологических, клинических и патофизиологических исследований. Слизистая носа при хроническом риносинусите претерпевает изменения, сходные с таковыми в слизистой бронхов при астме, включая отек слизистой, гиперплазию бокаловидных клеток и гипертрофию желез [10].

Увеличение содержания как ОБ, так и ОУ после воздействия холодового стимула свидетельствует об усилении и секреции слизистой носа, экссудации плазмы. Уровень белка существенно превышает уровень углеводной компоненты как до, так и после воздействия стимула (см. табл. 2). Различия между группами больных, отличаю-

щихся по гиперреактивности дыхательных путей, были несущественными, хотя больные из группы с сочетанной гиперреактивностью на оба стимула обычно имели более высокие значения ОБ и ОУ, чем больные из двух других групп (см. рис. 1, 2). Общий характер изменений показателей в группах больных после пробы может означать нормальную физиологическую реакцию на холодный воздух, а не патологический процесс. Это подтверждают положительные связи $\Delta\text{ОФВ}_1$ с изменением уровня ОУ сразу после дыхания холодным воздухом в общей группе больных и в группе 2 с гиперреактивностью дыхательных путей на оба стимула, а также с изменением содержания ОБ в группе 2. Однако, как показал корреляционный анализ между $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ИГХВ и содержанием ОУ в лаважной жидкости на 15- и 30-й мин после холодовой пробы, сохранение повышенного уровня ОУ в группе 2 в течение восстановительного периода, возможно, отражает аналогичные процессы в нижних дыхательных путях в соответствии с моделью единого респираторного тракта. Это, в свою очередь, может вести к ухудшению функции внешнего дыхания в ответ на ИГХВ.

Скорее неожиданный результат получен для индивидуальных муцинов MUC5AC и MUC5B, содержание которых оказалось крайне низким в назальной лаважной жидкости, а изменения после холодовой пробы часто носили обратный характер по сравнению с изменениями ОУ (см. рис. 1, 4). Это возможно связано как с природой этих муцинов, которые представляют собой крупные молекулы, что затрудняет работу с ними [18], так и с особенностью использовавшихся наборов для ИФА (Cusabio Biotech Co., Ltd.; Cloud-Clone Corp.). Используемые в наборе для образования комплекса с муцинами антитела получены против полипептидных фрагментов рекомбинантных белков. Поэтому любые изменения углеводного состава или белковой компоненты секретиремых муцинов могут влиять на специфичность антител, использованных при ИФА, к этим муцинам. Действительно, ранее показано, что муцины MUC5AC и MUC5B претерпевают сложный путь олигомеризации в процессе синтеза и секреции, так что конечная четверичная структура макромолекул зависит от условий микроокружения [19, 20].

Хотя количественное определение уровня муцинов MUC5AC и MUC5B методом ИФА имеет ограниченную диагностическую ценность [21], интерес представляют обнаруженная взаимосвязь между изменениями этих двух муцинов после пробы [9], а также меньшее снижение концентрации

обоих муцинов в группе пациентов с сочетанной гиперреактивностью дыхательных путей по сравнению с другими группами (см. рис. 3). Снижение уровня муцинов после холодовой пробы возможно связано с окислительным стрессом, в результате которого муцины могли бы подвергнуться окислению, изменить структуру молекул и стать менее узнаваемыми для антител из ИФА наборов. Однако больные из группы с сочетанной гиперреактивностью дыхательных путей показали наименьшее снижение MUC5AC и MUC5B (см. рис. 3) на фоне более высокого уровня ТБКРВ в назальной лаважной жидкости после пробы (см. рис. 5), что не подтверждает это предположение.

Повышение уровня маркера окислительного стресса (ТБКРВ) в слизистой носа после пробы с холодным воздухом (см. табл. 2, рис. 5) соответствует обнаруженному ранее увеличению продуктов перекисного окисления в нижних дыхательных путях после холодового воздействия [22], а, следовательно, может быть повреждающим фактором слизистой при дыхании холодным воздухом. Более высокий уровень ТБКРВ в группах 2 и 3 после пробы с холодным воздухом по сравнению с группой 1 хотя и был статистически недостоверным, свидетельствует в пользу того, что окислительный стресс является фактором развития реактивности дыхательных путей к ИГХВ и ИДВ.

α_2 -МГ был рекомендован для оценки экссудации плазмы в слизистой носа [23]. В среднем по всей совокупности больных содержание этого биомаркера возрастало в лаважной жидкости после пробы с холодным воздухом (см. табл. 2), а также в группах с сочетанной реактивностью и с ее отсутствием (см. рис. 4). Однако большой разброс значений для α_2 -МГ среди пациентов не может подтвердить повышенной экссудации плазмы крови по сравнению с изменениями ОБ в ответ на холодовой стимул. Эффект гипертонического раствора на слизистую носа был также несущественным в отношении экссудации α_2 -МГ, тогда как в присутствии гистамина гипертонический раствор значительно усиливал выход этого биомаркера [24]. Тем не менее если допущение о единстве физиологического состояния верхних и нижних дыхательных путей при БА верно, повышенная экссудация плазмы, то есть повышенная проницаемость кровеносных сосудов нижних дыхательных путей, может быть негативным фактором при воздействии осмотического стимула (дистиллированной воды). Так, в общей группе больных содержание α_2 -МГ в назальной жидкости сразу после дыхания холодным воздухом

имело отрицательную корреляцию с изменением ОФВ_1 в ответ на ИДВ, а у пациентов группы 2, показавших большее падение ОФВ_1 в ответ на ИДВ (см. табл. 1), обнаружена обратная связь этой величины с изменением уровня α_2 -МГ сразу после холодовой пробы по сравнению с начальным уровнем.

Таким образом, изменения общих маркеров секреции, экссудации и окислительного стресса (ОБ, ОУ, ТБКРВ) демонстрируют усиление этих процессов в слизистой носа в ответ на дыхание холодным воздухом, тогда как специфические биомаркеры (муцины MUC5AC и MUC5B, α_2 -МГ) не позволяют сделать столь однозначных выводов, что может отражать особенности этих биомаркеров. Отмечены статистически незначимые различия в содержании биомаркеров до и после дыхания холодным воздухом между группами больных, разделенных на основании бронхопровокационных проб на холодовой и гипоосмотический стимулы. Однако группа с сочетанной реактивностью дыхательных путей на оба стимула имела в целом более высокие показатели секреции, экссудации и окислительного стресса по сравнению с группами с изолированной реактивностью или ее отсутствием. Обнаруженная корреляция между $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ИГХВ и повышенным уровнем ОУ в течение восстановительного периода говорит в пользу вклада продолжительной секреции в развитие холодовой реактивности дыхательных путей. Аналогично корреляция между $\Delta\text{ОФВ}_1$ после ИДВ и увеличением уровня α_2 -МГ в назальной жидкости сразу после пробы с холодным воздухом указывает на потенциальную связь между повышенной экссудацией и осмотической реактивностью дыхательных путей. Следует обратить внимание на возможность использования этих биомаркеров при прогнозировании развития реактивности нижних дыхательных путей на холодовой и гипоосмотический стимулы.

ВЫВОДЫ

1. Дыхание холодным воздухом больными БА сопровождалось увеличением содержания общего белка, общих углеводов, ТБКРВ в назальной лаважной жидкости, что свидетельствует об усилении процессов секреции, экссудации и окислительного стресса слизистой носа в ответ на холодовой стимул. Анализ индивидуальных муцинов (растворимые формы MUC5AC и MUC5B) не подтвердил предположения об усилении их секреции, а увеличение уровня α_2 -макроглобулина было статистически недостоверным.

2. Группы больных с различной реактивностью дыхательных путей на холодовой и гипоосмотический стимулы не имели статистически значимых различий в содержании биомаркеров до и после дыхания холодным воздухом. Отмечены более выраженные показатели секреции и экссудации у больных БА с сочетанной гиперреактивностью дыхательных путей на холод и гипоосмотический стимул по сравнению с группами больных с реакцией на один из этих стимулов или с ее отсутствием. Окислительный стресс менее выражен у больных БА без реакции на оба стимула по сравнению с двумя другими группами.

3. Обнаруженные корреляции между величиной $ОФВ_1$ у больных БА и ее изменениями в ответ на бронхопровокационную пробу с холодным воздухом, с одной стороны, и содержанием биомаркеров секреции, с другой, свидетельствуют в пользу негативного эффекта продолжительной секреции муцинов после дыхания холодным воздухом на реакцию бронхов у больных астмой с сочетанной реактивностью дыхательных путей. У таких больных повышенная экссудация плазмы также может быть одним из факторов в развитии гипоосмотической реактивности.

4. Слизистая носа является перспективной моделью для исследования взаимосвязей и молекулярных основ процессов секреции, экссудации и окислительного стресса в дыхательных путях у больных бронхиальной астмой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Некрасов Э.В. – разработка концепции и дизайна, проведение экспериментальной части, анализ и интерпретация результатов, подготовка рукописи. Приходько А.Г. – дизайн исследования, клиническое обследование больных, обоснование рукописи, анализ и интерпретация результатов. Перельман Ю.М. – проверка критически важного интеллектуального материала, окончательное утверждение рукописи для публикации.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 14-25-00019) в части исследования осмотической гиперреактивности дыхательных путей и РФФИ (грант № 17-54-5316217) в части холод-индуцированной гиперсекреции.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Клиническое исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным комитетом по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания (протокол № 81Т от 29.07.14).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны Г.А. Макаровой (ДНЦ ФПД, г. Благовещенск) за помощь, оказанную при постановке иммуноферментного анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П., Ульяничев Н.В., Нарышкина С.В., Афанасьева Е.Ю. Особенности течения бронхиальной астмы у больных с изолированной и сочетанной гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой и гипоосмотический стимулы // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2014; 53: 36–41.
2. Naumov D.E., Perelman J.M., Kolosov V.P., Potapova T.A., Maksimov V.N., Zhou X. Transient receptor potential melastatin 8 gene polymorphism is associated with cold-induced airway hyperresponsiveness in bronchial asthma // *Respirology*. 2015; 20 (8): 1192–1197. DOI: 10.1111/resp.12605.
3. Naumov D.E., Kolosov V.P., Perelman J.M., Prihodko A.G. Influence of TRPV4 gene polymorphisms on the development of osmotic airway hyperresponsiveness in patients with bronchial asthma // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016; 469 (1): 260–263. DOI: 10.1134/S1607672916040074.
4. Cruz A.A., Togias A. Upper airways reactions to cold air // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2008; 8: 111–117. DOI: 10.1007/s11882-008-0020-z.
5. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma - Full Report 2007. U.S. Department of Health, National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. Available at: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.htm>.
6. Evans C.M., Koo J.S. Airway mucus: The good, the bad, the sticky // *Pharmacol. Therapeut.* 2009; 121: 332–348. DOI:10.1016/j.pharmthera.2008.11.001.
7. Persson C., Uller L. Roles of plasma exudation in asthma and COPD // *Clin. Experim. Allergy*. 2009; 39: 1626–1629. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2009.03373.x.

8. Khor Y.H., Teoh A.K.Y., Lam S.M., Mo D.C.Q., Weston S., Reid D.W., Walters E.H. Increased vascular permeability precedes cellular inflammation as asthma control deteriorates // *Clin. Experim. Allergy*. 2009; 39: 1659–1667. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2009.03349.x.
9. Некрасов Э.В., Перельман Ю.М., Приходько А.Г., Захарова Э.В., Макарова Г.А. Секреция муцинов слизистой носа в ответ на гипервентиляцию холодным воздухом у больных бронхиальной астмой с разной степенью тяжести и контролируемости заболевания // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2014; 53: 42–49.
10. Stachler R.J. Comorbidities of asthma and the unified airway // *Int. Forum Allergy Rhinol*. 2015; 5: S17–S22. DOI: 10.1002/alr.21615.
11. Greiff L., Andersson M., Coman W.B., Lindberg H., Marko-Varga G., Wallwork B., Persson C.G. Challenge-induced plasma exudation and mucinous secretion in human airways // *Clin. Physiol. Funct. Imaging*. 2005; 25: 241–245. DOI: 10.1111/j.1475-097X.2005.00615.x.
12. McDougall C.M., Blaylock M.G., Douglas J.G., Brooker R.J., Helms P.J., Walsh G.M. Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2008; 39: 560–568. DOI: 10.1165/rcmb.2007-0325OC.
13. Li M., 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: 626–634. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.04.032.
14. Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.-I., Lee Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format // *Anal. Biochem*. 2005; 339: 69–72. DOI: 10.1016/j.ab.2004.12.001.
15. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem*. 1976; 72: 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
16. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. В кн.: Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977: 392.
17. Wood D.M., Brennan A.L., Philips B.J., Baker E.H. Effect of hyperglycaemia on glucose concentration of human nasal secretions // *Clinical Sci*. 2004; 106: 527–533. DOI: 10.1042/CS20030333.
18. Davies J.R., Wickstrom C., Thornton D.J. Gel-forming and cell-associated mucins: preparation for structural and functional studies. In: McGuckin M.A., Thornton D.J. (eds.) *Mucins: methods and protocols*. Methods in molecular biology. New York: Springer Science + Business Media, LLC, 2012: 329. DOI: 10.1007/978-1-61779-513-8.
19. Sheehan J.K., Kirkham S., Howard M., Woodman P., Kutay S., Brazeau C., Buckley J., Thornton D.J. Identification of molecular intermediates in the assembly pathway of the MUC5AC mucin // *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 15698–15705. DOI: 10.1074/jbc.M313241200.
20. Ridley C., Kouvatso N., Raynal B.D., Howard M., Collins R.F., Desseyn J.L., Jowitt T.A., Baldock C., Davis C.W., Hardingham T.E., Thornton D.J. Assembly of the respiratory mucin MUC5B: a new model for a gel-forming mucin // *J. Biol. Chem*. 2014; 289: 16409–16420. DOI: 10.1074/jbc.M114.566679.
21. Некрасов Э.В., Макарова Г.А., Наумов Д.Е., Приходько А.Г., Ушакова Е.В., Перельман Ю.М. Использование иммуноферментного анализа для оценки секреции муцинов дыхательной системой человека // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 9: 126.
22. Горячкина Н.М., Чжоу С.Д., Ли Ц. Значение показателей оксидативного стресса у больных бронхиальной астмой с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2010; 38: 12–15.
23. Howarth P.H., Persson C.G.A., Meltzer E.O., Jacobson M.R., Durham S.R., Silkoff P.E. Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis // *J. Allergy Clin. Immunol*. 2005; 115: S414–S441. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.12.1134.
24. Greiff L., Andersson M., Wollmer P., Persson C.G.A. Hypertonic saline increases secretory and exudative responsiveness of human nasal airway in vivo // *Eur. Respir. J*. 2003; 21: 308–312. DOI: 10.1183/09031936.03.00290303.

Поступила в редакцию 21.03.2017

Утверждена к печати 10.05.2017

Некрасов Эдуард Витальевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания, г. Благовещенск.

Приходько Анна Григорьевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания, г. Благовещенск.

Перельман Юлий Михайлович, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе, руководитель лаборатории, Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания, г. Благовещенск.

(✉) Перельман Юлий Михайлович, e-mail: jperelman@mail.ru.

УДК 616.211-001.19:577.121.7:616.248

DOI 10.20538/1682-0363-2017-2-146-158

For citation: Nekrasov E.V., Prikhodko A.G., Perelman J.M. Nasal mucosa secretion exudation response to cold air in bronchial asthma patients. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (2): 146–158

Nasal mucosa secretion exudation response to cold air in bronchial asthma patients

Nekrasov E.V., Prikhodko A.G., Perelman J.M.

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

ABSTRACT

Background. Combined airway hyper responsiveness to cold and hypoosmotic stimuli in asthma patients results in impairment of lung respiration function and poor disease control compared to patients with isolated airway hyper responsiveness to only one of the stimuli or without such responsiveness that can be connected with edema or mucus hypersecretion.

Aim. The purpose of the study is the estimation of the processes of mucin secretion, plasma exudation and oxidative stress in response to cold air in asthma patients with combined airway responsiveness to cold and hypoosmotic stimuli using nasal mucosa as a model.

Materials and methods. 23 patients with asthma participated in the study. For the nasal lavage procedure, a nasal cavity was pre-washed at least three times in 5-min intervals with 5 ml saline solution ($\sim 36^\circ\text{C}$). A control nasal lavage was done 5 min after the last washing with a dwelling time of 1 min in the nasal cavity. Directly after the control lavage, a cold air nasal challenge was done: a participant was asked to breathe deeply at the pace of a metronome to ensure hyperventilation inhaling cold air (-20°C) through the nose and exhaling through the mouth for 5 min. Nasal lavages were taken at 1 min, 15, and 30 min after the challenge. Mucin secretion was estimated on the basis of total protein (TP) content, total carbohydrates (TC), and water-soluble forms of mucins MUC5AC and MUC5B in the lavage fluids. For the estimation of plasma exudation, the concentration of $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2$ -MG) was measured. Oxidative stress was estimated by the content of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in lavage fluid. Lung function and airway responsiveness were studied by the forced expiration spirometry method and the bronchial challenge tests with isocapnic cold air hyperventilation (CAHV) and distilled water inhalation (DWI).

Results. According to the bronchial challenge tests, the patients were divided into groups: 1) without airway responsiveness to the cold and osmotic stimuli ($n = 6$); 2) combined airway responsiveness to both stimuli (drop in FEV_1 by 10% or more after CAHV and DWI) ($n = 11$); 3) isolated airway responsiveness to only one of the stimuli ($n = 6$). In the total group of asthma patients, the mean content of TP, TC, $\alpha 2$ -MG, and TBARS increased by 63%, 109, 47, and 68%, respectively, after the cold air nasal challenge, whereas MUC5AC and MUC5B decreased by 15 and 20%, respectively. Secretion and exudation in the nasal mucosa were more pronounced in asthma patients of group 2 in comparison with other groups. Oxidative stress was lower in group 1. There were two interesting correlations between bronchi responsiveness to CAHV and DWI and changes in the content of the biomarkers after the cold air nasal challenge in group 2: 1) ΔFEV_1 after CAHV and TC level at 15 min ($r = -0,65$; $p = 0,0401$) and at 30 min ($r = -0,82$; $p = 0,0034$); 2) ΔFEV_1 after DWI and the change of $\alpha 2$ -MG at 1 min after the cold air nasal challenge ($r = -0,67$; $p = 0,0242$).

Conclusion. In accordance with the unified airway model, the found correlations may indicate that prolonged mucin secretion after cold air breathing is a negative factor for the bronchi response to cold air, whereas enhanced plasma exudation determines the bronchi responsiveness to a hypoosmotic stimulus. Nasal mucosa is a promising model for the simultaneous investigation of molecular processes of airway secretion, exudation and oxidative response in asthma patients.

Key words: asthma, nasal mucosa, secretion, exudation, oxidative stress, cold air challenge.

REFERENCES

- Prikhodko A.G., Perelman J.M., Kolosov V.P., Ul'yanychev N.V., Naryshkina S.V., Afanas'eva E.Yu. Osobennosti techeniya bronkhial'noy astmy u bol'nykh s izolirovannoy i sochetannoy giperreaktivnost'yu dykhatel'nykh putey na kholodovoy i gipoosmoticheskiy stimuly [Features of bronchial asthma clinical course in patients with isolated and combined airway hyperresponsiveness to cold and hypoosmotic stimuli] // *Byulleten' Fiziologii i Patologii Dykhaniya – Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2014; 53: 36–41 (in Russian).
- Naumov D.E., Perelman J.M., Kolosov V.P., Potapova T.A., Maksimov V.N., Zhou X. Transient receptor potential melastatin 8 gene polymorphism is associated with cold-induced airway hyperresponsiveness in bronchial asthma // *Respirology*. 2015; 20 (8): 1192–1197. DOI: 10.1111/resp.12605.
- Naumov D.E., Kolosov V.P., Perelman J.M., Prikhodko A.G. Influence of TRPV4 gene polymorphisms on the development of osmotic airway hyperresponsiveness in patients with bronchial asthma // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016; 469 (1): 260–263. DOI: 10.1134/S1607672916040074.
- Cruz A.A., Togias A. Upper airways reactions to cold air // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2008; 8: 111–117. DOI: 10.1007/s11882-008-0020-z.
- Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma - Full Report 2007. U.S. Department of Health, National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. Available at: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.htm>.
- Evans C.M., Koo J.S. Airway mucus: The good, the bad, the sticky // *Pharmacol. Therapeut.* 2009; 121: 332–348. DOI:10.1016/j.pharmthera.2008.11.001.
- Persson C., Uller L. Roles of plasma exudation in asthma and COPD // *Clin. Experim. Allergy*. 2009; 39: 1626–1629. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2009.03373.x.
- Khor Y.H., Teoh A.K.Y., Lam S.M., Mo D.C.Q., Weston S., Reid D.W., Walters E.H. Increased vascular permeability precedes cellular inflammation as asthma control deteriorates // *Clin. Experim. Allergy*. 2009; 39: 1659–1667. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2009.03349.x.
- Nekrasov E.V., Perelman J.M., Prikhodko A.G., Zakharova E.V., Makarova G.A. Sekretniya mutsinov slizistoy nosa v otvet na giperventilyatsiyu kholodnym vozdukhom u bol'nykh bronkhial'noy astmoy s raznoy stepen'yu tyazhesti i kontroliruemosti zabolovaniya [Mucin secretion in the nasal mucosa in response to cold air hyperventilation in asthmatics with different degrees of asthma control and disease severity] // *Byulleten' Fiziologii i Patologii Dykhaniya – Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2014; 53: 42–49 (in Russian).
- Stachler R.J. Comorbidities of asthma and the unified airway // *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2015; 5: S17–S22. DOI: 10.1002/alr.21615.
- Greiff L., Andersson M., Coman W.B., Lindberg H., Marko-Varga G., Wallwork B., Persson C.G. Challenge-induced plasma exudation and mucinous secretion in human airways // *Clin. Physiol. Funct. Imaging*. 2005; 25: 241–245. DOI: 10.1111/j.1475-097X.2005.00615.x.
- McDougall C.M., Blaylock M.G., Douglas J.G., Brooker R.J., Helms P.J., Walsh G.M. Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008; 39: 560–568. DOI: 10.1165/rcmb.2007-0325OC.
- Li M., 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: 626–634. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.04.032.
- Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.-I., Lee Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format // *Anal. Biochem.* 2005; 339: 69–72. DOI: 10.1016/j.ab.2004.12.001.
- Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Stal'naya I.D., Garishvili T.G. Metod opredeleniya malonovogo dial'degida s pomoshch'yu tiobarbiturovoy kisloty [Method for determination of malondialdehyde with thiobarbituric acid]. In book: Orekhovich V.N. (ed.) *Sovremennye metody v biokhimii* [Contemporary methods in biochemistry]. M.: Meditsina Publ., 1977: 392 (in Russian).
- Wood D.M., Brennan A.L., Philips B.J., Baker E.H. Effect of hyperglycaemia on glucose concentration of human nasal secretions // *Clinical Sci.* 2004; 106: 527–533. DOI: 10.1042/CS20030333.
- Davies J.R., Wickstrom C., Thornton D.J. Gel-forming and cell-associated mucins: preparation for structural and functional studies. In: McGuckin M.A., Thornton D.J. (eds.) *Mucins: methods and protocols*. Methods in molecular Biology. New York: Springer Science + Business Media, LLC, 2012: 329. DOI: 10.1007/978-1-61779-513-8.
- Sheehan J.K., Kirkham S., Howard M., Woodman P., Kutay S., Brazeau C., Buckley J., Thornton D.J. Identification of molecular intermediates in the assembly pathway of the MUC5AC mucin // *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 15698–15705. DOI: 10.1074/jbc.M313241200.
- Ridley C., Kouvatso N., Raynal B.D., Howard M., Collins R.F., Desseyn J.L., Jowitt T.A., Baldock C., Davis C.W., Hardingham T.E., Thornton D.J. Assembly of the respiratory mucin MUC5B: a new model for a gel-forming mucin // *J. Biol. Chem.* 2014; 289: 16409–16420. DOI: 10.1074/jbc.M114.566679.
- Nekrasov E.V., Makarova G.A., Naumov D.E., Prikhodko A.G., Ushakova E.V., Perelman J.M. Ispol'zovanie immunofermentnogo analiza dlya otsenki sekretnosti mutsinov

- dykhatel'noy sistemoy cheloveka [Application of enzyme immunoassay for estimation of mucin secretion in the human respiratory system] // *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika – Clinical Laboratory Diagnostics*. 2015; 9: 126 (in Russian).
22. Goriachkina N.M., Zhou S.D., Li C. Znachenie pokazateley oksidativnogo stressa u bol'nykh bronkhial'noy astmoy s kholodovoy giperreaktivnost'yu dykhatel'nykh putey [Significance of oxidative stress parameters in bronchial asthma in patients with cold airway hyperresponsiveness] // *Byulleten' Fiziologii i Patologii Dykhaniya – Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2010; 38: 12–15 (in Russian).
23. Howarth P.H., Persson C.G.A., Meltzer E.O., Jacobson M.R., Durham S.R., Silkoff P.E. Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: S414–S441. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.12.1134.
24. Greiff L., Andersson M., Wollmer P., Persson C.G.A. Hypertonic saline increases secretory and exudative responsiveness of human nasal airway in vivo // *Eur. Respir. J.* 2003; 21: 308–312. DOI: 10.1183/09031936.03.00290303.

Received March 21.2017

Accepted May 10.2017

Nekrasov Eduard V., PhD, Researcher, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, Russian Federation.

Prikhodko Anna G., DM, Senior Researcher, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, Russian Federation.

Perelman Juliy M., DM, Professor, Deputy Director, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, Russian Federation.

(✉) **Perelman Juliy M.**, e-mail: jperelman@mail.ru.