

УДК 611.233-018.73:616-001.19]612-092.4

DOI:10.12737/article\_5a276515739506.74942500

ЦИЛИАРНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕРЦАТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ БРОНХОВ ПРИ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*А.Н.Одиреев<sup>1</sup>, К.Ф.Килимиченко<sup>1</sup>, Н.С.Безруков<sup>1</sup>, Д.Е.Наумов<sup>1</sup>, Е.И.Карапетян<sup>1</sup>, В.П.Колосов<sup>1</sup>, Сян Дун Чжоу<sup>2</sup>, Ци Ли<sup>2</sup>, Ю.М.Перельман<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22<sup>2</sup>Госпитальная клиника Хайнаньского медицинского университета, КНР, г. Хайкоу, просп. Лонгхуа, 31

## РЕЗЮМЕ

До настоящего времени отсутствуют четкие представления о степени участия дисфункции мерцательного эпителия (МЭ) бронхов в формировании мукоцилиарных нарушений при холодовом воздействии на слизистую оболочку дыхательных путей. Цель исследования: изучить характер и степень выраженности изменений двигательной активности ресничек МЭ слизистой оболочки бронхов при воздействии холодового стимула на бронхобиоптат в эксперименте *in vitro*. Обследовано 10 больных бронхиальной астмой добровольцев. Всем проведена бронхоскопия с биопсией слизистой оболочки долевого бронха. Биоптат помещали в раствор Хенкса на предметное стекло, располагавшееся на поверхности термостоллика на элементах Пельтье, используемого для моделирования воздействия различных температурных режимов на МЭ. Регистрацию частоты биения ресничек МЭ (Гц) проводили с использованием микроскопа, камеры со встроенной высокочувствительной цифровой полнокадровой матрицей высокого разрешения и компьютера. Исходную запись частоты биения ресничек МЭ выполняли при комнатной температуре (+24°C), после чего постепенно повышали температуру раствора Хенкса до физиологических параметров и проводили повторную запись в контрольных точках опыта (28°C и 36°C). Затем температуру раствора снижали и вновь фиксировали частоту биения ресничек МЭ (контрольные точки эксперимента – 28°C, 21°C и 17°C). Установлено, что исходная частота биения ресничек МЭ колебалась в пределах от 6,74 до 3,77 Гц и составила в среднем 5,25±1,48 Гц (M±m). При нагревании раствора частота биения статистически достоверно возрастала: уже при температуре 28°C она составила 6,33±1,36 Гц (p=0,004) и оставалась на этом уровне при температуре 36°C – 7,14±1,63 Гц (p=0,002). Постепенное понижение температуры раствора продемонстрировало снижение частоты биения в сравнении с физиологическими параметрами (36°C): при 28°C до 6,12±1,31 Гц (p=0,121), при 21°C до 5,27±1,32 Гц (p=0,001) и при 17°C до 3,95±1,18 Гц (p=0,0001). К завершению эксперимента частота биения ресничек МЭ снижалась практически в два раза в сравнении с физиологическими параметрами (36°C). Разработана математическая модель, характеризующая поведение

ресничек МЭ при холодовом стрессе. Таким образом, результаты исследования демонстрируют выраженное снижение двигательной активности ресничек МЭ при холодовом стрессе, что подчеркивает отдельный существенный вклад функционального дисбаланса МЭ в патофизиологические механизмы гиперсекреторных нарушений при вдыхании холодного воздуха.

*Ключевые слова:* холодовый стимул, холодовый стресс, мерцательный эпителий бронхов, двигательная активность ресничек мерцательного эпителия.

## SUMMARY

CILINARY ACTIVITY OF BRONCHIAL EPITHELIUM UNDER EXPERIMENTAL COLD EXPOSURE *IN VITRO*A.N.Odireev<sup>1</sup>, K.F.Kilimichenko<sup>1</sup>, N.S.Bezrukov<sup>1</sup>, D.E.Naumov<sup>1</sup>, E.I.Karapetyan<sup>1</sup>, V.P.Kolosov<sup>1</sup>, Xiangdong Zhou<sup>2</sup>, Qi Li<sup>2</sup>, J.M.Perelman<sup>1</sup><sup>1</sup>Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation<sup>2</sup>The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, 31 Longhua Road, Longhua District, Haikou, Hainan, China

To date, the role of dysfunction of the bronchial ciliated epithelium (BCE) in the formation of mucociliary disorders during cold exposure has not been fully established. The aim of the study was to investigate the nature and severity of changes in the ciliary motility of the BCE under the influence of a cold stimulus *in vitro*. Ten volunteers with asthma underwent a bronchoscopy with biopsy of the lobar bronchus mucosa. The biopsy specimens were placed in a Hank's balanced salt solution (HBSS) on a slide, located on the thermal stage, used to simulate the effect of various temperature on the BCE. Ciliary beat frequency (CBF, Hz) was recorded using a microscope, high-sensitivity digital camera and computer with specially developed software. The initial recording of CBF was performed at 24°C, after which the temperature of HBSS was gradually increased to physiological level and repeated recording was made at the control points (28°C and 36°C). Then, the temperature of the solution was lowered and CBF was registered again at 28°C, 21°C and 17°C. The initial CBF of the BCE varied from 6.74 to 3.77 Hz with average of 5.25±1.48 Hz (M±m). There

was a statistically significant increase in CBF when the solution was heated: at 28°C it was  $6.33 \pm 1.36$  Hz ( $p=0.004$ ) and remained at this level up to 36°C –  $7.14 \pm 1.33$  Hz ( $p=0.002$ ). A gradual decrease in the solution temperature produced a reduction in CBF in comparison with the physiological conditions: 28°C –  $6.12 \pm 1.31$  Hz ( $p=0.121$ ), 21°C –  $5.27 \pm 1.32$  Hz ( $p=0.001$ ) and 17°C –  $3.95 \pm 1.18$  Hz ( $p=0.0001$ ). By the end of the experiment, CBF of the BCE decreased almost 2-fold in comparison with the physiological conditions. A mathematical model that characterizes the behavior of BCE cilia under cold stress was developed. Thus, the results of the study demonstrate a marked decrease in the motor activity of the BCE cilia under cold stress, which underlines a significant contribution of the functional disturbance of BCE to the pathophysiological mechanisms of hypersecretory disorders induced by inhalation of cold air.

*Key words:* cold stimulus, cold stress, bronchial ciliated epithelium, ciliated epithelium cilia motion activity.

Известно, что низкие сезонные температуры, характерные для территорий Сибири и Дальнего Востока, оказывают существенное влияние на организм человека [5]. Длительное вдыхание холодного воздуха может вызывать появление респираторных симптомов даже у здоровых лиц [16], а больные, страдающие обструктивной бронхолегочной патологией, в большей степени предрасположены к неблагоприятным температурным воздействиям на дыхательные пути [17]. По данным наблюдений, периоды сезонных похолоданий обычно сопровождаются увеличением частоты обострений бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких [14], что, в определенной степени, обусловлено наличием у части больных феномена холодовой гиперреактивности дыхательных путей [6].

Адаптация к холоду сопровождается функциональными и морфологическими изменениями со стороны органов дыхания [7]. Доказано, что низкие температуры провоцируют усиление реакций перекисного окисления липидов, что является одним из ведущих механизмов в структурном повреждении тканей бронхов и лёгких [10]. Важнейшим защитным механизмом легких является мукоцилиарная система, очистительная функция которой обеспечивается мукоцилиарным клиренсом (МЦК) [18, 29]. Эффективное осуществление МЦК возможно лишь при слаженной функции двух компонентов – реснитчатого аппарата эпителиального пласта и секреторной системы воздухоносных путей (секреторных клеток и белково-слизистых желез, расположенных в подслизистом слое) [18, 23, 24]. Несмотря на высокую организацию и чувствительность мукоцилиарной системы, при постоянном триггерном воздействии на слизистую оболочку дыхательных путей происходит снижение эффективности МЦК и формируется мукоцилиарная недостаточность (МЦН). Патологический феномен МЦН сопровождается дискринией, повышением адгезивных и вязкоэластических свойств трахеобронхиального секрета, наруше-

нием функции ресничек мерцательного эпителия (МЭ) бронхов, застоем и инфицированием мокроты [29, 31, 32, 34]. МЦН оказывает существенное влияние на развитие и прогрессирование многих респираторных заболеваний [4].

К настоящему времени существует множество экспериментальных работ, характеризующих патологические процессы, развивающиеся в органах дыхания животных при длительном влиянии на организм низких температур [7–9, 13, 21]. Однако механизмы холоду-индуцированной гиперсекреции при хронических обструктивных заболеваниях легких к настоящему времени изучены недостаточно. В частности, не до конца установлена степень участия дисфункции МЭ бронхов в формировании гиперсекреторных нарушений при действии холодного воздуха на слизистую оболочку дыхательных путей. В доступной нам литературе мы не встретили исследований, дающих четкое представление об особенностях функционирования цилиарного аппарата МЭ бронхов в условиях холодового стресса и характеризующих вклад цилиарной дисфункции в механизм гиперсекреторных нарушений. Ответ на этот вопрос в некоторой степени могут дать результаты экспериментального прижизненного (при помещении биоптата бронхов в камеру с культуральной средой) изучения частоты биения ресничек МЭ – основного количественного параметра, характеризующего движение ресничек.

Цель исследования: изучить характер и степень выраженности изменений двигательной активности ресничек МЭ слизистой оболочки бронхов при воздействии различных температурных режимов на бронхобиоптат в эксперименте *in vitro*.

#### Материалы и методы исследования

Обследовано 16 больных смешанной формой бронхиальной астмы (J 45.8), в том числе 6 мужчин и 10 женщин. Средний возраст пациентов составил  $48,1 \pm 1,3$  года, длительность заболевания –  $11,3 \pm 2,1$  лет. По критериям GINA легкое персистирующее течение астмы диагностировано у 7 больных, среднетяжелое – у 9 пациентов. Обследование больных проводили в период обострения заболевания в условиях пульмонологического отделения ДНЦ ФПД при условии снижения интенсивности клинических симптомов и достижения частичного фармакотерапевтического контроля астмы. Протокол исследования был одобрен Комитетом по биомедицинской этике ДНЦ ФПД. Больные знакомы с протоколом исследования и подписывали информированное согласие.

Всем пациентам проведена бронхофиброскопия с биопсией слизистой оболочки среднедолевого бронха. Бронхоскопию выполняли аппаратом BF-1 T20 (Olympus, Япония). Выраженность воспалительного процесса изучали с применением качественно-количественного показателя – индекса активности эндобронхита (в % от максимального значения), учитывающего комплекс эндоскопических признаков воспаления в дыхательных путях.

Для прижизненного исследования функциональной активности ресничек МЭ биоптат со шпоры среднедолевого бронха забирался и помещался в камеру с питательной средой Хенкса при комнатной температуре (+24°C). При помощи одноканального механического дозатора переменного объема BIONIT proline фирмы «Sartorius Biohit Liquid Handling» (Финляндия) биоптат переносили на предметное стекло с углублением в объем 0,01 мл раствора Хенкса, располагавшееся на поверхности разработанного нами прототипа термостолка на элементах Пельтье (рис. 1), используемого для моделирования воздействия различных температурных режимов на МЭ [3]. Термостолк поддерживает температуру от +2 до +50°C.

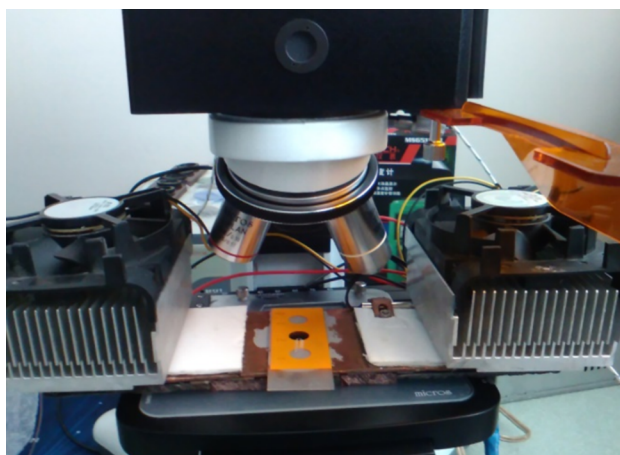


Рис. 1. Прототип авторского термостолка на элементах Пельтье.

Регистрацию двигательной активности ресничек МЭ проводили с использованием микроскопа Micros MC400A (Австрия), камеры Sony alpha 7 (Япония) со встроенной высокочувствительной цифровой полнокадровой матрицей высокого разрешения FullHD, способной производить запись с частотой 50 кадр/сек, и компьютера. Для обработки полученного с камеры видеоизображения использовали разработанные нами алгоритмы: фиксации изображения, поиска ресничек МЭ на изображении, регистрации движения ресничек МЭ, работа которых в совокупности позволила автоматизировать процесс регистрации двигательной активности ресничек МЭ [1, 2].

Исходную запись двигательной активности ресничек МЭ выполняли сразу же после помещения биоптата на предметное стекло в раствор Хенкса при комнатной температуре (+24°C). После этого постепенно повышали температуру раствора Хенкса до физиологических параметров и проводили повторную запись в контрольных точках опыта (28°C и 36°C). Затем температуру раствора снижали и вновь фиксировали частоту биения ресничек МЭ (контрольные точки эксперимента – 28°C, 21°C и 17°C). Контролируемый количественный параметр двигательной активности ресничек МЭ – частота биения (Гц).

Статистический анализ полученного материала проводили на основе стандартных методов вариационной статистики, с оценкой достоверности различий по

t-критерию Стьюдента ( $M \pm m$ ).

### Результаты исследования и их обсуждение

При проведении бронхоскопии воспалительные изменения в трахеобронхиальном дереве выявлены у всех 16 больных БА. Интенсивность воспаления была минимальной – в пределах 1-й степени (по 3-балльной системе). Анализ выраженности воспалительного процесса с использованием качественно-количественного показателя – индекса активности эндобронхита (в процентах от максимального значения – 100%), продемонстрировал низкие значения последнего – от 11 до 22% (в среднем,  $15,1 \pm 1,1\%$  от макс.). Вместе с тем, биение ресничек МЭ на поверхности биоптата определено не у всех участников эксперимента – только у 10 из 16 пациентов (62,5%). На материале от данных больных и проводились дальнейшие исследования.

При исходной записи при комнатной температуре (+24°C) частота биения ресничек МЭ колебалась в пределах от 6,74 до 3,77 Гц и составила в среднем  $5,25 \pm 1,48$  Гц. Полученные нами результаты свидетельствуют о низкой цилиарной активности МЭ бронхов у больных БА в сравнении со здоровыми лицами. Данный факт подтверждается исследованием М.А. Chilvers et al. [12], целью которого было определить структуру и частоту биения ресничек назального эпителия методом браш-биопсии у 76 здоровых детей и взрослых в возрасте от 6 до 43 лет. Установлено, что средняя частота биения у детей составила от 12,8 Гц, что было выше, чем у взрослых (11,5 Гц;  $p < 0,01$ ). Вместе с тем авторами выявлено, что и в здоровой популяции может присутствовать локализованное эпителиальное повреждение, формирующее области дискинезии ресничек. В общей совокупности пациентов 10% реснитчатой каймы имело дискинетический тип биения ресничек, все образцы имели признаки легкого эпителиального повреждения, ультраструктурные дефекты были обнаружены у 5% ресничек [12].

В настоящем исследовании при нагревании раствора частота биения статистически достоверно возросла в сравнении с исходными значениями (табл.): уже при температуре 28°C она увеличилась в среднем на 15,2% и составила  $6,33 \pm 1,36$  Гц ( $p < 0,01$ ); при температуре 36°C прирост составил 24,6% – до  $7,14 \pm 1,63$  Гц ( $p < 0,01$ ).

Постепенное понижение температуры раствора продемонстрировало снижение частоты биения в сравнении с физиологическими параметрами (36°C): при 28°C в среднем на 12,5% – до  $6,12 \pm 1,31$  Гц ( $p > 0,05$ ); при 21°C на 24,1% – до  $5,27 \pm 1,32$  Гц ( $p = 0,001$ ); при 17°C в среднем на 42% – до  $3,95 \pm 1,18$  Гц ( $p < 0,001$ ). Таким образом, к завершению эксперимента частота биения ресничек МЭ снижалась практически в два раза (рис. 2) в сравнении с показателями, установленными при параметрах температуры в пределах физиологических значений (36°C).

На рисунке 3 представлены характерные изменения частоты биения ресничек МЭ на поверхности биоптата среднедолевого бронха больного БА в зависимости от выбранных температурных режимов.

Таблица

**Характеристика частоты биения ресничек МЭ бронхов в общей совокупности исследованных бронхобиоптатов в зависимости от применяемых температурных режимов (M±m)**

Параметры	Контрольные точки опыта					
	24°C	28°C	36°C	28°C	21°C	17°C
Частота биения, Гц	5,25±1,48	6,33±1,36 p=0,004	7,14±1,63 p=0,002	6,12±1,31 p=0,105 p <sub>1</sub> =0,121	5,27±1,32 p=0,488 p <sub>1</sub> =0,001	3,95±1,18 p=0,050 p <sub>1</sub> =0,0001
Относительное значение, в % от max.	69,6±11,8	84,8±8,7 p=0,006	100 (94,2±7,9) p=0,002	81,7±7,9 p=0,077 p <sub>1</sub> =0,101	70,1±8,6 p=0,467 p <sub>1</sub> =0,0003	52,2±12,4 p=0,034 p <sub>1</sub> =0,00005

Примечание: p – уровень значимости различий по сравнению с исходными показателями (24°C); p<sub>1</sub> – уровень значимости различий по сравнению с параметрами биения ресничек МЭ при температуре 36°C.

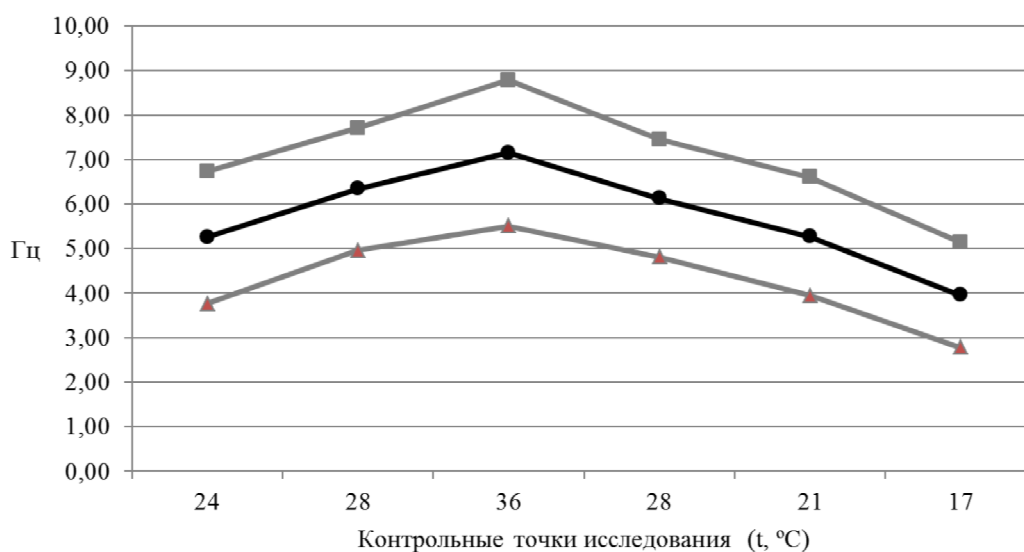


Рис. 2. Динамика изменения частоты биения ресничек МЭ бронхов (средние значения в общей совокупности исследованных бронхобиоптатов) при различных режимах температуры.

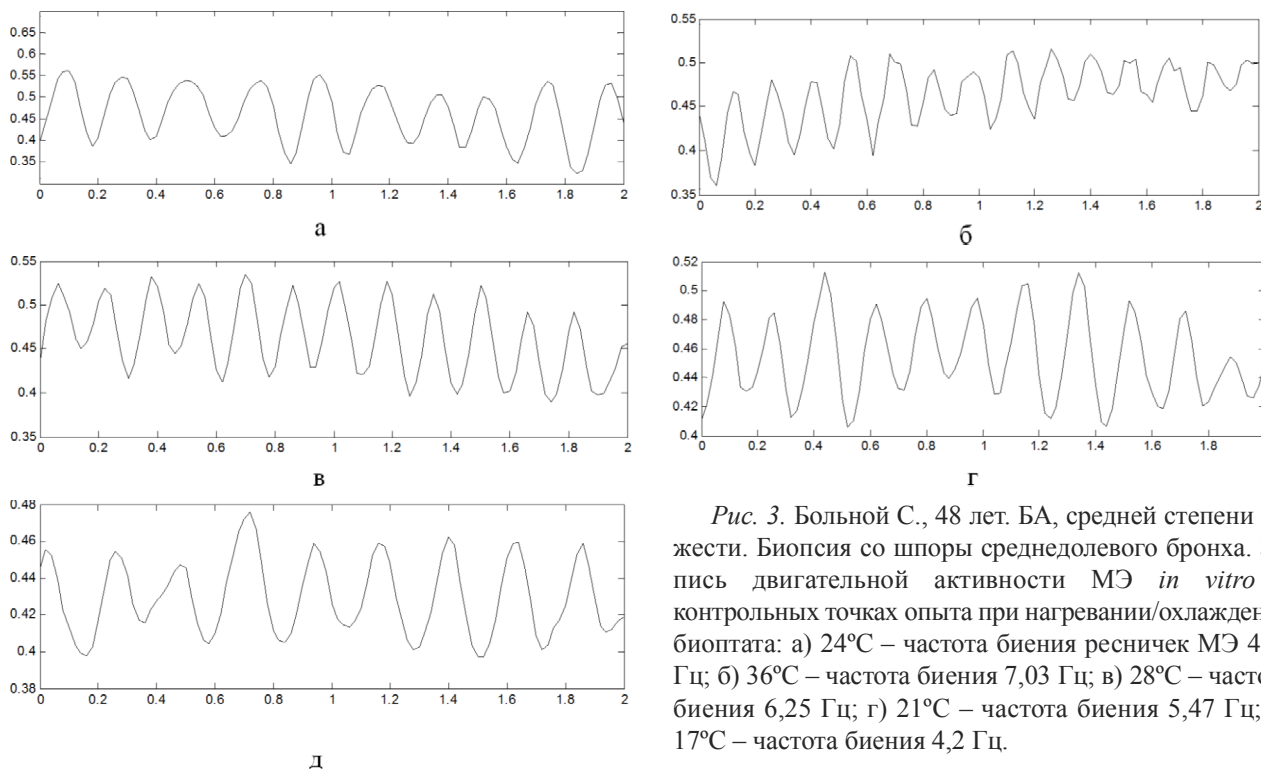


Рис. 3. Больной С., 48 лет. БА, средней степени тяжести. Биопсия со шпоры среднедолевого бронха. Запись двигательной активности МЭ *in vitro* в контрольных точках опыта при нагревании/охлаждении биоптата: а) 24°C – частота биения ресничек МЭ 4,69 Гц; б) 36°C – частота биения 7,03 Гц; в) 28°C – частота биения 6,25 Гц; г) 21°C – частота биения 5,47 Гц; д) 17°C – частота биения 4,2 Гц.

Полученные нами данные позволили разработать математическую модель, характеризующую поведение ресничек МЭ при влиянии различных температур окружающей среды (рис. 4).

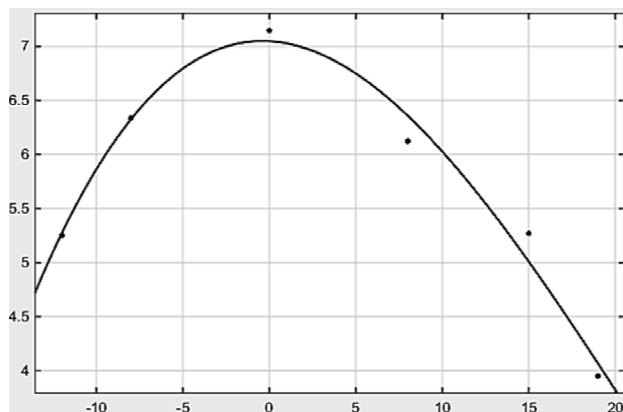


Рис. 4. Математическая модель зависимости частоты биения ресничек МЭ от температуры их функциональной среды.

В эксперименте бронхобиоптат вначале нагревали с 24 до 36°C, а затем охлаждали с 36 до 17°C. Из-за этого значения температур при нагреве накладываются на температуры при охлаждении, что влияет на результат моделирования. Для исключения этого влияния преобразуем числовой ряд температуры (24, 28, 36, 28, 21, 17) в приращение относительно максимально температуры (36°C), тогда получим ряд: -12, -8, 0, 8, 15, 19.

Для этого ряда и средних частот биения ресничек МЭ строим полином третьего порядка, характеризующий зависимость частоты биения МЭ от температуры нагрева или охлаждения:

$$Y = 0.00017 \times X^3 - 0.011 \times X^2 - 0.0089 \times X + 7$$

где Y – частота биения ресничек МЭ (Гц); X – приращение температуры (°C).

Среднее квадратичное отклонение модели (SSE) составило удовлетворительное значение в 0,1474 с коэффициентом детерминации, близким к 1 (R<sup>2</sup>=0,976). Следует отметить, что коэффициент детерминации (R-квадрат) для модели с константой принимает значения от 0 до 1. Чем ближе значение коэффициента к 1, тем сильнее зависимость. При оценке регрессионных моделей это интерпретируется как соответствие модели данным. Для приемлемых моделей предполагается, что коэффициент детерминации должен быть хотя бы не меньше 50% (в этом случае коэффициент множественной корреляции превышает по модулю 70%). Модели с коэффициентом детерминации выше 80% можно признать достаточно хорошими (коэффициент корреляции превышает 90%). Значение коэффициента детерминации 1 означает функциональную зависимость между переменными. Используя полученное уравнение, мы можем оценить, какова будет частота биения при нагреве или охлаждении ресничек МЭ в диапазоне температур от 17 до 36°C.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют статистически достоверное изменение функциональной активности ресничек МЭ при воздействии различных температур в эксперименте *in vitro*. При на-

гревании раствора частота биения статистически достоверно возрастала в сравнении с исходными значениями. Наиболее высокая частота биения установлена при параметрах температуры в пределах физиологических значений (36°C), что является методическим обоснованием для проведения такого рода исследований с обязательным учетом температурного фактора и их стандартизации. С клинических позиций это может улучшить диагностику цилиарной дисфункции у пациентов с респираторной патологией и оптимизировать программу комплексной терапии.

Охлаждение раствора привело к выраженному (в два раза) статистически достоверному снижению частоты биения ресничек МЭ в сравнении с физиологическими параметрами (36°C), а при температуре 17°C – к достоверному снижению в сравнении с исходными значениями. Данный факт может свидетельствовать о существенном вкладе функционального дисбаланса МЭ в патофизиологические механизмы МЦН при вдыхании холодного воздуха и расширить представления о патологических процессах, развивающихся в органах дыхания при длительном влиянии на организм низких температур.

Действительно, существующие многочисленные исследования в основном направлены на изучение транспортной функции мукоцилиарной системы и в полной мере не объясняют полученные результаты с патофизиологических позиций. Так, в работе D.A.Diesel et al. [13] установлено снижение скорости эвакуации слизи из полости носа телят на 24% при температуре окружающей среды 2-4°C. Авторы утверждают, что при экстремальном воздействии холода кондиционирование воздуха на уровне трахеи не является полным. Высказано мнение, что воздействие холода увеличивает осаждение патогенных частиц в легких и одновременно снижает МЦК верхних дыхательных путей, тем самым предрасполагая к инфицированию бронхолегочной системы.

Механизмы нарушений мукоцилиарного транспорта чрезвычайно сложны. Безусловно, нельзя считать основополагающим в угнетении мукоцилиарного транспорта только одно его звено (цилиарный аппарат или реологию слизи). Мукоцилиарная система выполняет свою функцию благодаря слаженной работе мерцательного и секреторного аппарата бронхиального дерева. По данным L.Trout et al. [28], определяющая роль в функционировании мукоцилиарного транспорта принадлежит трансмембранному движению электролитов, поддерживающих осмотический градиент по обе стороны клеточной мембраны и влияющих на абсорбцию воды. Это обеспечивает оптимальный ионный состав и объём перилиарной жидкости, определяющей реологические свойства слизи, такие как вязкость и эластичность. В работе D.M.Goto et al. [15] показано, что осмотически активные препараты, например, диуретики, за счет влияния на работу трансмембранных ионных каналов в клетках респираторного эпителия способны изменять реологические свойства слизи. Даже незначительные изменения в

слое перилиарной жидкости приводят к нарушению взаимодействия в системе ресничка/слизь и снижению мукоцилиарного транспорта [23, 33].

В ритме сокращения ресничек определяющим является импульс, приводящий их к движению. При изучении работы ресничек было установлено, что в их составе находится АТФ, от запасов которого зависит частота и длительность работы цилиарного аппарата. АТФ локализуется в микротрубочках и базальных тельцах, которые играют большую роль в реснитчатом ударе. АТФ обеспечивает энергетические процессы моторных белков – динеиновых и кинезиновых моторов [27, 30]. Мембраны ресничек соприкасаются с плазматической мембраной клетки и содержат специфические рецепторы и белки ионных каналов, которые инициируют сигнальный путь. Установлено, что в МЭ экспрессируются неселективные катионные каналы TRPV4, которые рассматриваются в качестве кандидата для участия в связывании изменений вязкости перилиарной жидкости с образованием сигнала  $Ca^{2+}$ , необходимого для авторегуляции биения [11]. Ритмичная работа ресничек регулируется гуморальными механизмами, практически не координируется нервной системой и возможна даже вне организма. Предполагают, что регуляция частоты их биения связана с мембранным потенциалом клетки [22, 28]. Для адекватного функционирования цилиарного аппарата должны соблюдаться определенные условия в слизистой оболочке дыхательных путей, такие как достаточное содержание АТФ, ионов кальция, оксида азота.

В настоящее время установлена ключевая роль трансдукции холодового стимула в бронхиальном эпителии посредством активации термочувствительных рецепторов TRPM8 в генерации воспалительной реакции и индукции холодовой бронхоконстрикции и гиперсекреции слизи, что открывает новые возможности в понимании механизмов возникновения и хронизации воспалительного процесса в дыхательных путях в условиях холодного климата. Механизм нарушения функциональной активности МЭ бронхов при воздействии холода может быть связан с деятельностью термочувствительных TRP-каналов, в частности, холодовых рецепторов TRPM8. Получены данные о том, что гиперпродукция муцина 5AC, основного компонента бронхиальной слизи, опосредована TRPM8, локализованными в бронхиальном эпителии и функционирующими как катионные каналы [19, 20]. TRPM8 отвечают за восприятие специфического температурного диапазона. Спектр активирующих температур для TRPM8 несколько различается по данным разных авторов, но в среднем составляет 8-28°C, с оптимумом активности при 10°C. Канал является неселективным проводником катионов и проницаем для ионов кальция [25], обладает способностью регулировать содержание ионов кальция в цитоплазме клетки, который, как известно, является вторичным мессенджером многих сигнальных каскадов. В исследовании A.S.Sabnis и соавт. [26] была впервые идентифицирована неполная изоформа TRPM8, локализованная пре-

имущественно на мембране эндоплазматического ретикула в эпителии дыхательных путей, и сделано предположение о его рецепторной роли в опосредовании адаптивных механизмов при локальном охлаждении. Было показано, что активация неполного варианта TRPM8 в бронхиальном эпителии сопровождается как выбросом кальция из эндоплазматического ретикула, так и поступлением кальция внутрь клетки.

Таким образом, результаты выполненного нами исследования демонстрируют выраженное снижение двигательной активности ресничек МЭ при холодном воздействии, что подчеркивает отдельный существенный вклад функционального дисбаланса МЭ в патофизиологические механизмы МЦН при вдыхании холодного воздуха.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №17-54-53162 ГФЕН\_а).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Безруков Н.С., Шматок М.И. Новый способ регистрации активности ресничек мерцательного эпителия дыхательных путей // Материалы IX международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2015) / под общ. ред. В.П.Колосова. Благовещенск, 2015. С.50–56.
2. Безруков Н.С., Одиреев А.Н., Шматок М.И. Алгоритмы регистрации движения ресничек мерцательного эпителия // Материалы X международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2016) / под общ. ред. В.П.Колосова. Благовещенск, 2016. С.33–36.
3. Безруков Н.С., Одиреев А.Н., Килимиченко К.Ф., Перельман Ю.М. Термостоллик для микроскопа на элементах Пельтье // Материалы XI международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2017) / под общ. ред. В.П.Колосова. Благовещенск, 2017. С.44–49.
4. Колосов В.П., Добрых В.А., Одиреев А.Н., Луценко М.Т. Диспергационный и мукоцилиарный транспорт при болезнях органов дыхания. Владивосток: Дальнаука, 2011. 276 с.
5. Колосов В.П., Манаков Л.Г., Кику П.Ф., Полянская Е.В. Заболевания органов дыхания на Дальнем Востоке России: эпидемиологические и социально-гигиенические аспекты. Владивосток: Дальнаука, 2013. 220 с.
6. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П. Гиперреактивность дыхательных путей. Владивосток: Дальнаука, 2011. 204 с.
7. Прокопенко А.В., Целуйко С.С., Долгополов А.С., Чжоу С.Д., Ли Ц. Адаптация эпителия трахеи в широком диапазоне температур (экспериментальное исследование) // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2013. Вып.48. С.63–69.
8. Целуйко С.С. Ультраструктурная организация мукоцилиарного клиренса в норме и при холодном воздействии // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2009. Вып.33. С.7–12.

9. Целуйко С.С., Красавина Н.П., Семенов Д.А., Чжоу С.Д., Ли Ц. Гистохимическая характеристика углеводных соединений в воздухоносном отделе легких крыс под действием холодного воздуха // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2012. Вып.46. С.69–76.
10. Шаповаленко Н.С. Доровских В.А., Коршунова Н.В., Штарберг М.А., Сластин С.С., Невмывако Е.Е. Влияние холодового стресса на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему тканей экспериментальных животных // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2011. Вып.39. С.22–25.
11. Andrade Y.N., Fernandes J., Vázquez E., Fernández-Fernández J.M., Arniges M., Sánchez T.M., Villalón M., Valverde M.A. TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity // *J. Cell Biol.* 2005. Vol.168, №6. P.869–874. doi: 10.1083/jcb.200409070
12. Chilvers M.A., Rutman A., O’Callaghan C. Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults // *Thorax*. 2003. Vol.58, №4. P.333–338.
13. Diesel D.A., Lebel J.L., Tucker A. Pulmonary particle deposition and airway mucociliary clearance in cold-exposed calves // *Am. J. Vet. Res.* 1991. Vol.52, №10. P.1665–1671.
14. Donaldson G.C., Wedzicha J.A. COPD exacerbations. 1: Epidemiology // *Thorax*. 2006. Vol.61, №2. P.164–168.
15. Goto D.M., Torres G.M., Seguro A.C., Saldiva P.H., Lorenzi-Filho G., Nakagawa N.K. Furosemide impairs nasal mucociliary clearance in humans // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2010. Vol.170, №3. P.246–252. doi: 10.1016/j.resp.2010.01.013
16. Jammes Y., Delvolgo-Gori M.J., Badier M., Guillot C., Gazazian G., Parlenti L. One-year occupational exposure to a cold environment alters lung function // *Arch. Environ. Health*. 2002. Vol.57, №4. P.360–365.
17. Harju T., Mäkinen T., Näyhä S., Laatikainen T., Jousilahti P., Hassi J. Cold-related respiratory symptoms in the general population // *Clin. Resp. J.* 2010. Vol.4, №3. P.176–185.
18. Knowles M.R., Boucher R.C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways // *J. Clin. Invest.* 2002. Vol.109, №5. P.571–577.
19. Li M.C., Perelman J.M., Kolosov V.P., Zhou X.D. Effects of transient receptor potential melastatin 8 cation channels on inflammatory reaction induced by cold temperatures in human airway epithelial cells // *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2011. Vol.34, №10. P.757–761.
20. Li M., Li Q., Yang G., Kolosov V.P., Perelman J.M., Zhou X.D. Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. Vol.128, №3. P.626–634.
21. Li M.C., Yang G., Zhou X.D., Tseluyko S.S., Perelman J.M. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hypersecretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats // *Int. J. Mol. Med.* 2014. Vol.33, №1. P. 83–90.
22. Luk C.K., Dulfano M.J. Effect of pH, viscosity and ionic-strength changes on ciliary beating frequency of human bronchial explants // *Clin. Sci. (Lond.)*. 1983. Vol.64, №4. P.449–451. doi: 10.1042/cs0640449
23. Mall M.A. Role of cilia, mucus, and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models // *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 2008. Vol.21, №1. P.13–24. doi: 10.1089/jamp.2007.0659
24. Matsui H., Randell S.H., Peretti S.W., Davis C.W., Boucher R.C. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces // *J. Clin. Invest.* 1998. Vol.102, №6. P.1125–1131.
25. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol // *Cell*. 2002. Vol.108, №5. P.705–715.
26. Sabnis A.S., Shadid M., Yost G.S., Reilly C.A. Human Lung Epithelial Cells Express a Functional Cold-Sensing TRPM8 Variant // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008. Vol.39, №4. P.466–474. doi: 10.1165/rcmb.2007-0440OC
27. Satir P., Christensen S.T. Overview of structure and function of mammalian cilia // *Annu. Rev. Physiol.* 2007. Vol.69. P.377–400. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236
28. Trout L., King M., Feng W., Inglis S.K., Ballard S.T. Inhibition of airway liquid secretion and its effect on the physical properties of airway mucus // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol.274, №2(Pt1). P.258–263.
29. Wanner A., Salathe M., O’Riordan T.G. Mucociliary clearance in the airways // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996. Vol.154, №6(Pt1). P.1868–1902.
30. Wyatt T.A., Forget M.A., Adams J.M., Sisson J.H. Both cAMP and cGMP are required for maximal ciliary beat stimulation in a cell-free model of bovine ciliary axonemes // *Am. J. Physiol Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005. Vol.288, №3. P.546–551. doi: 10.1152/ajplung.00107.2004
31. Yaghi A., Dolovich M.B. Airway Epithelial Cell Cilia and Obstructive Lung Disease // *Cells*. 2016. Vol.5, №4. P.40. doi:10.3390/cells5040040
32. Yaghi A., Zaman A., Cox G., Dolovich M.B. Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects // *Respir. Med.* 2012. Vol.106, №8. P.1139–1147. doi: 10.1016/j.rmed.2012.04.001
33. Yaghi A., Zaman A., Dolovich M.B. The direct effect of hyperosmolar agents on ciliary beating of human bronchial epithelial cells // *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 2012. Vol.25, №2. P.88–95. doi: 10.1089/jamp.2011.0914
34. Yan X., Cao G.M., Wang X.L., Zhou X.D. Study of mucus secretion and aquaporin-5 expression of bronchial epithelium cultured in hypotonic medium // *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2007. Vol.19, №4. P.214–216.

## REFERENCES

1. Bezrukov N.S., Shmatok M.I. New method of registration of cilia activity of airway ciliate. In: Materials of the 9<sup>th</sup> International Scientific Conference "System Analysis in Medicine". Blagoveshchensk; 2015: 50–56 (in Russian).
2. Bezrukov N.S., Odireev A.N., Shmatok M.I. Algorithms of registration for beating cilia of ciliated epithelium. In: Materials of the 10<sup>th</sup> International Scientific Conference "System Analysis in Medicine". Blagoveshchensk; 2016: 33–36 (in Russian).
3. Bezrukov N.S., Odireev A.N., Kilimichenko K.F., Perelman J.M. Heating table for microscope based on the Peltier element. In: Materials of the 11<sup>th</sup> International Scientific Conference "System Analysis in Medicine". Blagoveshchensk; 2017: 44–49 (in Russian).
4. Kolosov V.P., Dobrykh V.A., Odireev A.N., Lutsenko M.T. Dispergation and mucociliary transport at respiratory diseases. Vladivostok: Dal'nauka; 2011 (in Russian).
5. Kolosov V.P., Manakov L.G., Kiku P.F., Polyanskaya E.V. Respiratory diseases in the Far East of Russia: epidemiologic and social-hygienic aspects. Vladivostok: Dal'nauka; 2013 (in Russian).
6. Prikhodko A.G., Perelman J.M., Kolosov V.P. Airway hyperresponsiveness. Vladivostok: Dal'nauka; 2011 (in Russian).
7. Prokopenko A.V., Tseluyko S.S., Dolgoplov A.S., Zhou X.D., Li Q. Tracheal epithelium adaptation under the wide range of temperatures (experimental study). *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2013; 48:63–69 (in Russian).
8. 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).
9. 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. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2012; 46:69–76 (in Russian).
10. Shapovalenko N.S., Dorovskikh V.A., Korshunova N.V., Shtarberg M.A., Slastin S.S., Nevmyvako E.E. Influence of cold stress on lipid peroxidation intensity and tissue antioxidative system in experimental animals. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2011; 39:22–25 (in Russian).
11. Andrade Y.N., Fernandes J., Vázquez E., Fernández-Fernández J.M., Arniges M., Sánchez T.M., Villalón M., Valverde M.A. TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity. *J. Cell Biol.* 2005; 168(6):869–874. doi: 10.1083/jcb.200409070
12. Chilvers M.A., Rutman A., O'Callaghan C. Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. *Thorax* 2003; 58(4):333–338.
13. Diesel D.A., Lebel J.L., Tucker A. Pulmonary particle deposition and airway mucociliary clearance in cold-exposed calves. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52(10):1665–1671.
14. Donaldson G.C., Wedzicha J.A. COPD exacerbations. 1: Epidemiology. *Thorax* 2006; 61(2):164–168.
15. Goto D.M., Torres G.M., Seguro A.C., Saldiva P.H., Lorenzi-Filho G., Nakagawa N.K. Furosemide impairs nasal mucociliary clearance in humans. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2010; 170(3):246–252. doi: 10.1016/j.resp.2010.01.013
16. Jammes Y., Delvolgo-Gori M.J., Badier M., Guillot C., Gazazian G., Parienti L. One-year occupational exposure to a cold environment alters lung function. *Arch. Environ. Health* 2002; 57(4):360–365.
17. Harju T., Mäkinen T., Näyhä S., Laatikainen T., Jousilahti P., Hassi J. Cold-related respiratory symptoms in the general population. *Clin. Resp. J.* 2010; 4(3):176–185.
18. Knowles M.R., Boucher R.C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* 2002; 109(5):571–577.
19. Li M.C., Perelman J.M., Kolosov V.P., Zhou X.D. Effects of transient receptor potential melastatin 8 cation channels on inflammatory reaction induced by cold temperatures in human airway epithelial cells. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2011; 34(10):757–761.
20. Li M., Li Q., Yang G., Kolosov V.P., Perelman J.M., Zhou X.D. Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 128(3):626–634.
21. Li M.C., Yang G., Zhou X.D., Tseluyko S.S., Perelman J.M. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hypersecretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats. *Int. J. Mol. Med.* 2014; 33(1):83–90.
22. Luk C.K., Dulfano M.J. Effect of pH, viscosity and ionic-strength changes on ciliary beating frequency of human bronchial explants. *Clin. Sci. (Lond.)* 1983; 64(4):449–451. doi: 10.1042/cs0640449
23. Mall M.A. Role of cilia, mucus, and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 2008; 21(1):13–24. doi: 10.1089/jamp.2007.0659
24. Matsui H., Randell S.H., Peretti S.W., Davis C.W., Boucher R.C. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J. Clin. Invest.* 1998; 102(6):1125–1131.
25. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 2002; 108(5):705–715.
26. Sabnis A.S., Shadid M., Yost G.S., Reilly C.A. Human Lung Epithelial Cells Express a Functional Cold-Sensing TRPM8 Variant. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008. Vol.39, №4. P.466–474. doi: 10.1165/rcmb.2007-0440OC
27. Satir P., Christensen S.T. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu. Rev. Physiol.* 2007; 69:377–400. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236
28. Trout L., King M., Feng W., Inglis S.K., Ballard S.T. Inhibition of airway liquid secretion and its effect on



the physical properties of airway mucus. *Am. J. Physiol.* 1998; 274(2 Pt1):L258–263.

29. Wanner A., Salathe M., O’Riordan T.G. Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154 (6 Pt1):1868–1902.

30. Wyatt T.A., Forget M.A., Adams J.M., Sisson J.H. Both cAMP and cGMP are required for maximal ciliary beat stimulation in a cell-free model of bovine ciliary axonemes. *Am. J. Physiol Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 288(3):L546–L551. doi: 10.1152/ajplung.00107.2004

31. Yaghi A., Dolovich M.B. Airway Epithelial Cell Cilia and Obstructive Lung Disease. *Cells.* 2016. Vol.5, №4. P.40. doi:10.3390/cells5040040

32. Yaghi A., Zaman A., Cox G., Dolovich M.B. Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Respir. Med.* 2012; 106(8):1139–1147. doi: 10.1016/j.rmed.2012.04.001

33. Yaghi A., Zaman A., Dolovich M.B. The direct effect of hyperosmolar agents on ciliary beating of human bronchial epithelial cells. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 2012; 25(2):88–95. doi: 10.1089/jamp.2011.0914

34. Yan X., Cao G.M., Wang X.L., Zhou X.D. Study of mucus secretion and aquaporin-5 expression of bronchial epithelium cultured in hypotonic medium. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2007; 19(4):214–216.

*Поступила 02.11.2017*

*Контактная информация*

*Андрей Николаевич Оди́реев,*

*доктор медицинских наук,*

*руководитель лаборатории профилактики неспецифических заболеваний легких,*

*Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,*

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

*E-mail: bulletin.fpd@mail.ru*

*Correspondence should be addressed to*

*Andrey N. Odireev,*

*MD, PhD, DSc, Head 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: bulletin.fpd@mail.ru*