



Афлитонов М.А.¹ ✉, Стрельникова Е.Г.², Горшков А.Н.³, Варюшина Е.А.³,
Безрукова Е.В.², Артюшкин С.А.²

¹ Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

² Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

Патоморфология фармакорезистентности хронического риносинусита

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Артюшкин С.А. – редактирование статьи; Афлитонов М.А. – написание и редактирование статьи, сбор и анализ данных; Безрукова Е.В. – редактирование статьи; Стрельникова Е.Г. – сбор и анализ данных; Горшков А.Н. – сбор и анализ данных; Варюшина Е.А. – анализ данных.

Подана: 12.09.2022

Принята: 12.12.2022

Контакты: maksim-aflitonov@yandex.ru

Резюме

Введение. Прогрессирование хронического полипозного риносинусита (ХПРС) на фоне применения топических глюкокортикостероидов (тГКС) является одной из главных проблем современной оториноларингологии. Модифицированная, полипозно деградированная слизистая затрудняет однородное поступление и распределение тГКС в гипертрофированных и полипозных тканях. Для повышения биодоступности тГКС необходимо изучить связь прогрессирующей дегенерации слизистой носа с биораспределением мометазона в тканях носовых полипов.

Цель. Выявить и охарактеризовать патоморфологические изменения при ХПРС, оценить их влияние на локальную концентрацию мометазона в полипозной ткани.

Материалы и методы. Проведено обследование фрагментов нативных тканей 153 пациентов с ХПРС (исследование проводилось *in vitro*), возраст пациентов от 18 до 53 лет. Средний возраст составил $38,2 \pm 6,9$ года. Среди них мужчин – 69 (46%), женщин – 84 (56%). Препараты изучали в световой микроскоп DMLB (Leica Microsystems AG, Германия). Концентрацию мометазона фуората определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) диализата полипозной ткани. Диализат полипозной ткани получали методом микродиализа нативных тканей человека.

Результаты. Основной патоморфологической закономерностью при ХПРС является отечный (гидратационный) синдром. Эпителиальная инфильтрация выявлена у 7,14% пациентов, эпителиальная гипергидратация – у 78,5%, эпителиальная гипогидратация – у 14,36% пациентов до начала терапии тГКС.

Заключение. Эпителиальная инфильтрация характеризуется повышенным накоплением мометазона в полипозной ткани ($136,3 \pm 29,1$ нг/мл), умеренной чувствительностью к мометазону (СТ Lund-Mackay, SNOT-22), умеренной эозинофильной инфильтрацией и начальными признаками нарушения архитектоники. Эпителиальная

гипергидратация отличается пониженным накоплением мометазона в полипозной ткани ($92,3 \pm 12,2$), сниженной чувствительностью к мометазону (CT Lund-Mackay, SNOT-22), повышенной эозинофильной инфильтрацией и прогрессирующими признаками нарушений архитектоники. Эпителиальная гипогидратация характеризуется адекватным накоплением мометазона в полипозной ткани ($123,1 \pm 24,1$), сниженной чувствительностью к мометазону (CT Lund-Mackay, SNOT-22), пониженной эозинофильной инфильтрацией и слабыми признаками нарушений архитектоники.

Ключевые слова: резистентность к мометазону, высокоэффективная жидкостная хроматография, полипы носа, хронический риносинусит, мометазона фуруат

Aflitonov M.¹ ✉, Strelnicova E.², Gorshkov A.³, Varushina E.³, Bezrukova E.², Artyushkin S.²

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

³ Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint-Petersburg, Russia

Pathomorphology of Chronic Rhinosinuitis Pharmacoresistance

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Artyushkin S. – editing; Aflitonov M. – text writing and editing, data collecting and analyzing; Bezrukova E. – editing; Strelnicova E. – data collecting and analyzing; Gorshkov A. – data collecting and analyzing; Varushina E. – data collecting and analyzing.

Submitted: 12.09.2022

Accepted: 12.12.2022

Contacts: maksim-aflitonov@yandex.ru

Abstract

Introduction. Chronic rhinosinuitis progression with use of topical glucocorticosteroids (tGCS) is one of the main problems of modern otorhinolaryngology. Damaged mucosa makes difficulties for tGCS intake and distribution in hypertrophied tissues. To increase tGCS bioavailability, a relationship between mucosa degradation histotypes and mometasone biodistribution should be studied.

Purpose. To determine chronic rhinosinuitis mucosa degradation histotypes, and to evaluate their effect on mometasone furoate local concentration.

Materials and methods. Hystological materials of 153 patients were examined; the age of patients was from 18 to 53 years. The average age was $38.2 \text{ years} \pm 6.9$. Of these patients 69 (46%) were men and 84 (56%) were women. Mometasone concentration was determined by HPLC method of polyposis tissue dialysate. Polypous tissue dialysate was obtained by microdialysis of native human tissues. DMLB light microscope (Leica Microsystems AG, Germany) was used for preparations examination.

Results. Edematous (hydration) syndrome was the main pathomorphological pattern in CRSwNP. Epithelial infiltration was detected in 7.14% of patients, epithelial overhydration in 78.5%, and epithelial hypohydration in 14.36% of patients before starting tGCS therapy.

Conclusion. Epithelial infiltration is characterized by increased mometasone accumulation in polyposis tissue (136.3 ± 29.1 ng/ml), moderate sensitivity to mometasone (CT Lund-Mackay, SNOT-22), moderate eosinophilic infiltration and initial signs of tissue degradation. Epithelial hyperhydration is characterized by reduced mometasone accumulation in polyposis tissue (92.3 ± 12.2), decreased sensitivity to mometasone (ST Lund-Mackay, SNOT-22), increased eosinophilic infiltration, and progressive signs of tissue degradation. Epithelial hypohydration is characterized by adequate accumulation of mometasone in polyposis tissue (123.1 ± 24.1), reduced sensitivity to mometasone (CT Lund-Mackay, SNOT-22), reduced eosinophilic infiltration, and weak signs of tissue degradation.

Keywords: mometasone hormone resistance, high-performance liquid chromatography, nasal polyps, chronic rhinosinusitis

■ ВВЕДЕНИЕ

Прогрессирование различных форм хронического полипозного риносинусита (ХПРС) на фоне применения топических глюкокортикостероидов (тГКС) является одной из главных проблем современной оториноларингологии. Развитие отеочного синдрома интерстиция и клинического полипоза контролируется несколькими внешними и внутренними факторами. Патогенетически отек слизистых ОНП образуется в результате увеличения микрососудистого давления, повышения микрососудистой проницаемости и снижения лимфооттока через серозную поверхность в полость носа. Биомеханические нарушения архитектоники интерстиция, развивающиеся при трансформации отеочной слизистой в полипозную ткань под действием высокого микрососудистого давления, замыкают данный патологический круг [1].

С момента появления гидрокортизона тГКС стали краеугольным камнем лечения большинства воспалительных заболеваний слизистой придаточных пазух и полости носа благодаря их способности уменьшать воспаление. Модифицированная, полипозно деградированная слизистая затрудняет однородное поступление и распределение тГКС в гипертрофированных и полипозных тканях. Кроме того, неоднородность в микросреде полипоза приводит к сильным градиентам скорости клеточной пролиферации и присутствию областей гипоксии, которые влияют на чувствительность клеток к тГКС [2]. Современные исследования свидетельствуют о том, что данные факторы, затрагивающие микросреду полипоза, опосредуют длительную устойчивость к лекарственной фармакотерапии. Потенциальные стратегии преодоления лекарственной устойчивости ХПРС требуют выявления типовых паттернов нарушения архитектоники интерстиция. Для повышения биодоступности тГКС необходимо изучить связь прогрессирующей дегенерации слизистой носа с биораспределением мометазона в тканях носовых полипов [2, 3].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить и охарактеризовать патоморфологические изменения при ХПРС, оценить их влияние на локальную концентрацию мометазона в полипозной ткани.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения лабораторных тестов использовался операционный материал 153 пациентов с ХПРС (исследование проводилось *in vitro*), возраст пациентов от 18 до 53 лет. Средний возраст составил $38,2 \pm 6,9$ года. Среди них мужчин – 69 (46%), женщин – 84 (56%). Количество пациентов, не получавших тГКС на дооперационном этапе (отказ от лечения), – 56, получавших лечение тГКС на дооперационном этапе, – 97 человек. Операционный материал перед фиксацией при необходимости разрезали на кусочки размером максимально $5 \times 5 \times 5$ мм. Помещали образцы в 10 мл 4% раствора параформальдегида (ПФ) (Sigma, США) в ФСБ, фиксировали 40 мин при $+4^\circ\text{C}$. Срезы на предметных стеклах окрашивали по стандартной методике гематоксилином Карацци и эозином («Биовитрум», Россия), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в среду «Блик». Препараты изучали в световой микроскоп DMLB (Leica Microsystems AG, Германия). Микрофотографии получали с помощью встроенной камеры DC300 (Leica Microsystems AG, Германия). Минимум 3 среза от каждого образца изучали на нескольких увеличениях ($\times 160$, $\times 320$, $\times 640$). Для уточнения картины препараты исследовали на большом увеличении ($\times 1600$) с использованием масляной иммерсии. Для получения биологической жидкости, содержащей мометазон, использовалась методика микродиализа тканей. Хроматографический анализ выполняли на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1260 Infinity с диодно-матричным детектором. Условия проведения анализа: колонка Phenomenex Luna C18 (2), $150 \times 2,00$ мм, 5 мкм при температуре 28°C , и предколонка Eclipse XDB-C18, $4,6 \times 12,5$ мм, 5 мкм. В качестве подвижной фазы в режиме градиентного элюирования использовали смесь ацетонитрила в бидистиллированной воде (от 25 до 80% ацетонитрила). Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программ Microsoft Excel 2010, Statsoft Statistica 10.0. При сравнении групп для выборок с нормальным распределением использовался t-критерий Стьюдента, для непараметрических выборок – u-критерий Манна – Уитни, W-критерий Вилкоксона применялся для сравнения парных связанных групп, если распределение показателей хотя бы в одной группе отличалось от нормального. Оценка нормальности распределения проводилась с помощью теста Колмогорова – Смирнова, для оценки корреляции использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех препаратах при ХПРС определялись схожие патоморфологические изменения: выраженные структурные неоднородности с железистыми, эпителиальными и стромальными клетками (фибробласты и другие воспалительные элементы), встроенные во внеклеточный матрикс и питающиеся сосудистой сетью. Компоненты незначительно варьировались от одного места к другому у пациентов со всеми типами полипоза с формированием эпителиальной инфильтрации (стромальной дегенерации) в разных эволюционных состояниях / разной степени выраженности. Строма полипоза была связана с измененным внеклеточным матриксом и повышенным количеством фибробластов. Состояние эпителиального слоя и внеклеточного матрикса сильно различалось среди полипоза как по количеству, так и по составу.

Основной патоморфологической закономерностью при ХПРС является отечный (гидратационный) синдром. Оценивая операционные гистологические препараты

Таблица 1
Характеристика гистологических паттернов при ХПРС в зависимости от приема тГКС, М±m
Table 1
Histological patterns characteristics (depending on hormone therapy), M±m

Показатель	Эпителиальная инфильтрация	Эпителиальная гипергидратация	Эпителиальная гипогидратация
Пациенты после 12 месяцев лечения тГКС (97 человек)	35,05%	47,42%	17,52%
Пациенты без лечения тГКС (56 человек)	7,14%	78,5%	14,36%

Примечание: достоверные различия между пациентами в подгруппах (p < 0,05).

пациентов, принимавших тГКС на предоперационном этапе, начальную эпителиальную инфильтрацию выявили у 35,05%. Эпителиальная гипергидратация выявлена у 47,42% пациентов, эпителиальная гипогидратация – у 17,52%. Обнаружено изменение структуры гистологических паттернов по сравнению с пациентами без терапии тГКС (уменьшение доли гипергидратации, увеличение доли инфильтрации) (табл. 1). Данные результаты показывают потенциальную возможность тГКС оказывать ремоделирующее действие на полипозно измененную слизистую [4].

Гормончувствительная форма (стабильна при нерегулярных курсах низких доз тГКС) выявлена у 46% пациентов, гормонзависимая форма (стабильна при регулярных курсах рекомендованных доз тГКС) – у 31% пациентов, гормонрезистентная форма (нестабильна при регулярных курсах высоких доз тГКС) – у 23% пациентов (Lund-Mackay, SNOT-22) [5] (табл. 2).

Эпителиальная инфильтрация в 23% опосредует развитие гормончувствительной формы, в 6% – гормонзависимой формы, в 4% – гормонрезистентной формы [6]. Микрофотография и схема патоморфологического строения начальной эпителиальной инфильтрации представлены на рис. 1.

Эпителиальная гипергидратация в 21% опосредует развитие гормончувствительной формы, в 24% – гормонзависимой формы, в 2% – гормонрезистентной формы [7]. Микрофотография и схема патоморфологического строения эпителиальной гипергидратации представлены на рис. 2.

Таблица 2
Характеристика гистологических паттернов при ХПРС (12 месяцев применения тГКС), М±m
Table 2
Histological patterns characteristics (with 12-month hormone therapy), M±m

Показатель	Эпителиальная инфильтрация	Эпителиальная гипергидратация	Эпителиальная гипогидратация
Содержание мометазона в полипах (нг/мл) (после 12 месяцев лечения)	136,3 ± 29,1	92,3 ± 12,2	123,1 ± 24,1
Чувствительность к мометазону	ч23%; з36%; р4%	ч21%; з24%; р2%	ч2%; з1%; р17%
Гистологический тип полипоза (12 месяцев лечения тГКС)	э53%; н36%; л11%	э73%; н19%; л8%	э23%; н67%; л10%
СТ Lund-Mackay (баллы после 12 месяцев лечения)	14,88 ± 0,32	34,11 ± 0,31	10,52 ± 0,23
SNOT-22 (баллы после 12 месяцев лечения)	39,43 ± 0,18	72,21 ± 0,54	41,32 ± 0,54

Примечания: достоверные различия между пациентами в подгруппах (p < 0,05); ч – гормончувствительная форма; з – гормонзависимая форма; р – гормонрезистентная форма; э – эозинофильный; н – нейтрофильный; л – лимфоплазмочитарный.

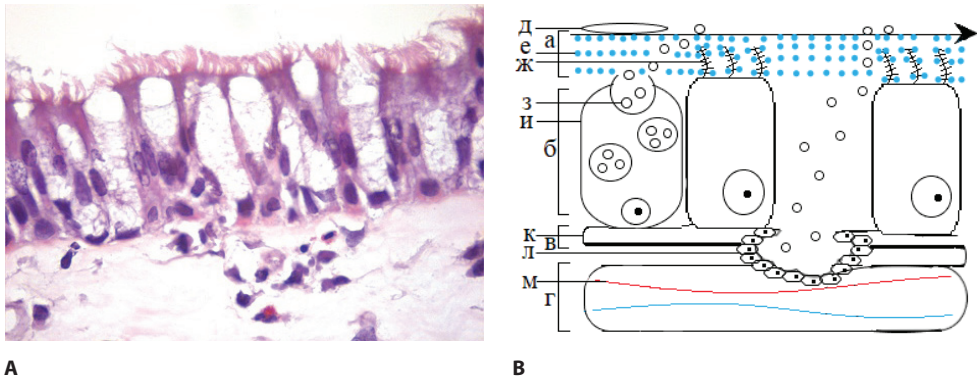


Рис. 1. Микрофотография и схема патоморфологического строения начальной эпителиальной инфильтрации: А – микрофотография препаратов полипозной ткани пациента с идиопатическим полипозом (начальная эпителиальная инфильтрация). Эпителиальная выстилка на разных участках полипа и реснички сохранены, гипертрофия бокаловидных клеток. Начальная стадия эпителиальной инфильтрации. Оригинальное увеличение $\times 1600$; В – схематическое представление гистотканевых слоев пациента с эпителиальной инфильтрацией при ХПРС: а – перилиарный водянистый слой; б – эпителиальный слой; в – базальная мембрана; г – подслизистый слой; д – слизистый поверхностный слой; е – конденсат жидкости на ресничках; ж – реснички; з – муцин; и – бокаловидная клетка; к – базальная мембрана; л – подслизистые железы; м – сосудистая сеть

Fig. 1. Micrograph and diagram of pathomorphological structure of the initial epithelial infiltration: A – patient polyposis tissue microphotography (initial epithelial infiltration). Epithelial lining in different parts of the polyp and cilia are preserved, goblet cell hypertrophy. The initial stage of epithelial infiltration. Original magnification: $\times 1600$; В – схематическое представление гистотканевых слоев пациента с эпителиальной инфильтрацией при ХПРС: а – перилиарный водянистый слой; б – эпителиальный слой; в – базальная мембрана; г – подслизистый слой; д – слизистый поверхностный слой; е – конденсат жидкости на ресничках; ж – реснички; з – муцин; и – бокаловидная клетка; к – базальная мембрана; л – подслизистые железы; м – сосудистая сеть

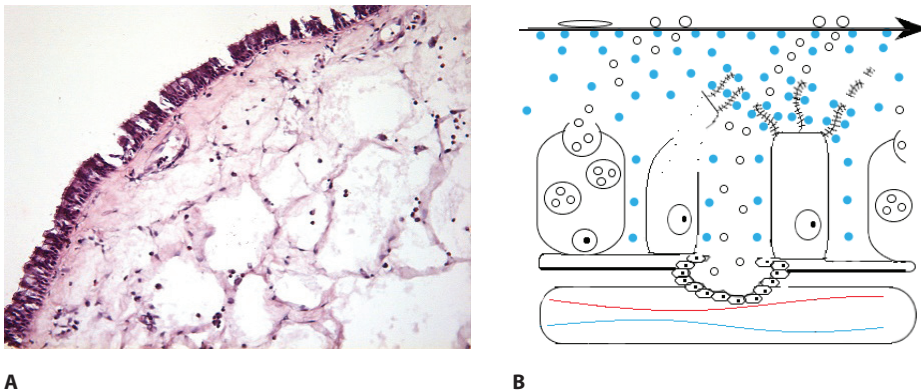


Рис. 2. Микрофотография и схема патоморфологического строения эпителиальной гипергидратации: А – микрофотография препаратов полипозной ткани пациента с идиопатическим полипозом (эпителиальная гипергидратация). Участки деструкции эпителиальной выстилки, частичная потеря ресничек. Гипергидратация эпителиального и перилиарного слоя. Оригинальное увеличение $\times 1600$; В – схематическое представление

Fig. 2. Micrograph and diagram of pathomorphological structure of epithelial hyperhydration: A – patient polyposis tissue microphotography (epithelial hyperhydration). Epithelial lining destruction areas, partial loss of cilia. Hyperhydration of epithelial and periciliary layers. Original magnification $\times 1600$; В – схематическое представление

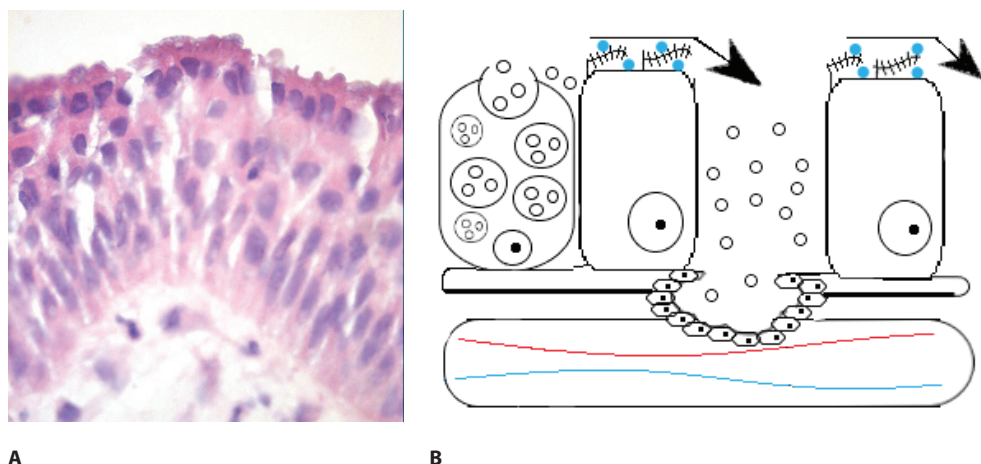


Рис. 3. Микрофотография и схема патоморфологического строения эпителиальной гипогидратации: А – микрофотография препаратов полипозной ткани пациента с идиопатическим полипозом (эпителиальная гипогидратация). Гипокинезия ресничек. Гипогидратация эпителиального и перилиарного слоя. Оригинальное увеличение $\times 1600$; В – схематическое представление
Fig. 3. Micrograph and diagram of pathomorphological structure of epithelial hypohydration: A – patient polyposis tissue microphotography (epithelial hypohydration). Hypokinesia of cilia. Hypohydration of epithelial and periciliary layers; B – schematic representation of patient tissue layers (epithelial hyperhydration) in CRSwNP

Эпителиальная гипогидратация в 2% опосредует развитие гормончувствительной формы, в 1% – гормонзависимой формы, в 17% – гормонрезистентной формы [8]. Микрофотография и схема патоморфологического строения эпителиальной гипогидратации представлены на рис. 3.

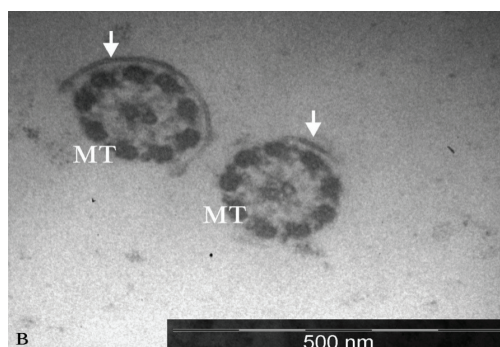


Рис. 4. Микрофотография ультраструктур полипозной ткани пациента с идиопатическим полипозом (эпителиальная гипергидратация). Утрата плазматических мембран, окружающих ресничку
Fig. 4. Patient polyposis ultrastructure tissue microphotography (epithelial hyperhydration). Loss of plasma membranes surrounding the cilium

Для анализа характера поражения ультраструктур выполнялась электронная микроскопия. Анализ показал схожие ультраструктурные изменения при эпителиальной гипогидратации и эпителиальной инфильтрации (отсутствие деструкции придаточного и клеточного аппарата) [9]. При детальном ультраструктурном анализе срезов ресничек эпителиальной гипергидратации обнаруживается, что в них сохраняется характерный набор микротрубочек и ассоциированных с ними моторных белков (аксонемальный комплекс), однако полностью утрачивается плазматическая мембрана, окружающая ресничку (рис. 4).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпителиальная инфильтрация характеризуется повышенным накоплением мометазона в полипозной ткани ($136,3 \pm 29,1$ нг/мл), умеренной чувствительностью к мометазону (СТ Lund-Mackay, SNOT-22), умеренной эозинофильной инфильтрацией и начальными признаками нарушения архитектоники. Эпителиальная гипергидратация отличается пониженным накоплением мометазона в полипозной ткани ($92,3 \pm 12,2$), сниженной чувствительностью к мометазону (СТ Lund-Mackay, SNOT-22), повышенной эозинофильной инфильтрацией и прогрессирующими признаками нарушений архитектоники. Эпителиальная гипогидратация характеризуется адекватным накоплением мометазона в полипозной ткани ($123,1 \pm 24,1$), сниженной чувствительностью к мометазону (СТ Lund-Mackay, SNOT-22), пониженной эозинофильной инфильтрацией и слабыми признаками нарушений архитектоники.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Campbell R.G. Risks and management of long-term corticosteroid use in chronic rhinosinusitis. *Current Opinion Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 2018;26(1):1–7. DOI: 10.1097/MOO.0000000000000421.
2. Aflitonov M.A., Artyushkin S.A., Partsernyak S.A. Verification and treatment of resistant chronic rhinosinusitis with nasal polyps at multimorbid cardiovascular pathology. *HERALD of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov*. 2017;9(2):90–96. (in Russian)
3. Lu H., Lin X.S., Yao D.M. Increased serum amyloid A in nasal polyps is associated with systemic corticosteroid insensitivity in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a pilot study. *European Archive Otorhinolaryngology*. 2018;275(2):401–408. DOI: 10.1007/s00405-017-4809-z.
4. Varyushina, Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Kravchenko E.V., Sukhareva Yu.V., Aflitonov M.A., Simbirtsev A.S. Study of local inflammatory response in different clinical forms of chronic polypous rhinosinusitis. *Medical Immunology*. 2022;24(3):621–636. (in Russian)
5. Zhang Y.Y., Lou H.F., Wang C.S. Mechanisms underlying glucocorticoid resistance in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2018;53(2):154–160. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2018.02.017.
6. Bezrukova E.V., Khmel'nikskaya M.A., Aflitonov M.A. Modern aspects of immunopathogenesis of chronic polyposis rhinosinusitis. *Russian otorhinolaryngology*. 2017;1(3):16–23. (in Russian)
7. Lee S.I., Lane A.O. Chronic rhinosinusitis as a multifactorial inflammatory disorder. *Current Infectious Disease Reports*. 2011;13(2):159–168.
8. Aflitonov M.A., Artyushkin S.A., Partsernyak S.A., Naumov S.Y., Partsernyak A.S., Topanova A.A. Specific features of melatonin metabolism in chronic rhinosinusitis with nasal polyps associated with multimorbid cardiovascular pathology. *Russian otorhinolaryngology*. 2016;5(84):14–21. (in Russian)
9. Arancibia C., Langdon C., Mullol J. Lack of additive benefit of oral steroids on short-term postoperative outcomes in nasal polyposis. *Laryngoscope*. 2020;130(12):2742–2747. DOI: 10.1002/lary.28347.