

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ БРОНХОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ**М.Т.Луценко***Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАН, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22***РЕЗЮМЕ**

Проведена комплексная характеристика морфофункциональных изменений в слизистой оболочке бронхов больных бронхиальной астмой на различных стадиях течения заболевания. Морфогистохимическими и иммуногистохимическими методами обследовано 75 больных средней и тяжелой степенью тяжести астмы. Установлено, что в процессе развития заболевания в слизистой оболочке бронхов возникают тяжелые морфофункциональные изменения. При средней и тяжелой формах болезни в слизистую оболочку проникает большое количество лимфоцитов и тучных клеток, выбрасывающих провоспалительные интерлейкины и биогенноактивные вещества, которые через базальную мембрану проникают в эпителий и формируют большое количество клеток в состоянии апоптоза. Эпителий разрушается. При тяжелой стадии заболевания он представлен однослойным недифференцированным эпителием, который подвергается действию со стороны NK-лимфоцитов.

Ключевые слова: бронхиальная астма, апоптоз, нормальные киллеры.

SUMMARY**MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF BRONCHI MUCOSA AT BRONCHIAL ASTHMA****M.T.Lutsenko**

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

The complex characteristic of morphofunctional changes in bronchi mucosa of bronchial asthma patients at different stages of the disease clinical course was conducted. Morphohistochemical and immunohistochemical methods were used to examine 75 patients with asthma of moderate and severe degree. It was found out that during the development of the disease there were severe morphofunctional changes in the bronchi mucosa. At moderate and severe forms of the disease a lot of lymphocytes and mast cells get into the mucosa; they send anti-inflammatory interleukins and biogenic active substances which penetrate into the epithelium through the basal membrane and form a great number of cells in the state of apoptosis. The epithelium disintegrates. At the severe disease there is the one-layer undifferentiated epithelium which is affected by NK-lymphocytes.

Key words: bronchial asthma, apoptosis, NK-lymphocytes.

Бронхиальная астма (БА) относится к числу наиболее распространенных заболеваний, общее число больных приближается к 7 млн человек. Несмотря на успехи, достигнутые в диагностике и лечении астмы [1, 2, 12] отмечается рост смертности при этом заболевании [11, 13].

В основе необратимых процессов при длительном течении БА лежат тяжелые нарушения как в организме больного в целом, так и нарастающие морфофункциональные изменения в стенке бронхиального дерева [7, 8, 9]. К общим патологическим процессам, прежде всего, необходимо отнести иммунологические сдвиги, а также гипоксические изменения в организме, нарастающие по мере перехода от легкой к тяжелой степени тяжести заболевания.

Гипоксия проявляется как в условиях дефицита кислорода во внешней среде при неблагоприятных условиях в атмосферном воздухе окружающей человека среды [4, 6, 10], так и в результате разных патологических состояний, связанных с нарушением функций дыхательной, сердечно-сосудистой систем, а также транспортной функции крови [5], особенно у женщин в период беременности. Нарушение синтеза энергии в этих условиях приводит к снижению уровня внутриклеточного АТФ ниже нормы и сопряженному подавлению энергозависимых процессов, что лежит в основе функционально-метаболических нарушений, характерных для гипоксии [3, 5].

Исходя из вышеизложенного, целью исследования явилась комплексная характеристика морфофункциональных изменений в слизистой оболочке бронхов у больных БА на различных стадиях течения заболевания.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе пульмонологического отделения Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАН. Все исследования проведены с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с учетом человека» с поправками 2008 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ №266 от 19.06.2003 г.

Обследовано 75 больных БА средней и тяжелой степени тяжести. Диагноз астмы устанавливали исходя из характерных для данного заболевания клинических симптомов: появление приступов удушья, изменений показателей проходимости воздухоносных путей, обратимости бронхиальной обструкции при пробе с бронхолитиками >15%. Диагностика степени тяжести

заболевания проводилась согласно классификации ВОЗ.

Было выделены следующие группы пациентов: 1 группа – 25 больных БА средней степени тяжести; 2 группа – 35 больных тяжелой формой заболевания; 3 группа (контрольная) – 15 здоровых добровольцев.

Комплексное обследование осуществлялось при первичном поступлении пациента в стационар в процессе 3 недельного наблюдения и лечения. Больным проводилась бронхоскопия при помощи бронхофиброскопа BF IT-20 (Olympus, Япония) под местной анестезией. Забор материала со слизистой оболочки среднедолевого бронха и сегментарных бронхов базальной пирамиды нижней доли правого легкого осуществляли биопсийными щипцами через инструментальный канал бронхоскопа. Для морфологического исследования материал фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде на 0,1 М какодилатном буфере (pH-7,4) в течение 1 часа, отмывали в 0,1 М какодилатном буфере (pH-7,4) с добавлением сахарозы. Постфиксацию проводили 2% четырехокисью осмия в течение 25 мин. Заливка проводилась в аралдит и эпон 812. Полутонкие срезы готовили на ультрамикротоме LKB-8800 (Швеция).

Для морфогистохимического анализа были применены следующие методы окраски: пикрофуксином по Ван Гизону для оценки строения соединительной и мышечной ткани. Для выявления нейтральных полисахаридов применяли метод по Ван-Дуйну. Оценка строения лимфоцитов периферической крови выполнялась на мазках из лейкоцитарной пленки, полученной после центрифугирования цельной крови, окрашенных метиловым фиолетовым с целью выявле-

ние строения цитозоля лимфоцитов.

Иммуногистохимические исследования проводились с помощью моноклональных антител фирмы «Dako» (ЗАО «ФИНБИО», Санкт-Петербург) Моноклональный антитело к CD 95 (нормальные киллеры). Иммунный статус изучался на проточном цитофлуориметре Coulter Epics XL-MCL (Becton Coulter, США). Плотность продуктов гистохимических реакций изучалась по программе Bio Vision (США).

Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента (t). Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Взаимосвязь между показателями определяли с помощью коэффициента корреляции Пирсона (r).

Результаты исследования и их обсуждение

Одним из характерных проявлений у больных БА является нарушение иммунологического статуса. На первое место можно поставить увеличение в их организме иммуноглобулина IgE. У лиц со средней степенью тяжести астмы его содержание в периферической крови увеличивается до $375,0 \pm 25,0$ МЕ, по мере нарастания тяжести течения заболевания количество IgE повышается до $400,0 \pm 32,0$ МЕ. Наряду с этим у больных БА происходят значительные изменения в содержании интерлейкинов, которые имеют существенные отличия по сравнению с группой здоровых лиц (табл. 1). Так, если уже при средней тяжести заболевания количество IL-1 было в пределах $270,5 \pm 3,0$ пг/мл, то при тяжелой степени астмы его содержание увеличивается до $350,5 \pm 8,0$ пг/мл (контроль – $103,4 \pm 2,3$ пг/мл). Подобные изменения наблюдались и в отношении других интерлейкинов, от которых зависит процесс нарастания воспаления (табл. 1).

Таблица 1

Показатели цитокинового статуса у больных БА и здоровых лиц

Показатели	БА средней тяжести	Тяжелая БА	Здоровые лица	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
IL-1, пг/мл	$270,5 \pm 3,0$	$350,5 \pm 8,0$	$103,4 \pm 2,3$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$
IL-4, пг/мл	$40,9 \pm 4,0$	$50,6 \pm 2,0$	$16,6 \pm 0,9$	$<0,05$	$<0,001$	$<0,001$
IL-8, пг/мл	$14,2 \pm 1,2$	$18,5 \pm 0,45$	$12,0 \pm 0,3$	$<0,05$	$>0,05$	$<0,001$
IFN- γ , пг/мл	$60,0 \pm 15,0$	$160,7 \pm 8,0$	$29,6 \pm 1,7$	$<0,001$	$<0,05$	$<0,001$

Примечание: p_{1-2} – уровень значимости различий показателей между группами больных БА средней и тяжелой степени тяжести; p_{1-3} – между группами больных БА средней тяжести и контролем; p_{2-3} – между тяжелой БА и контролем.

Учитывая существенные различия в содержании IL-1 у больных БА тяжелой и среднетяжелой астмой в сравнении со здоровыми лицами можно полагать, что цитокины играют ведущую роль в поддержании хронического воспаления. Отмечена отрицательная корреляционная зависимость между уровнем IL-1 и сывороточным IgM ($r = -0,51$; $p < 0,05$), что свидетельствует о тесном взаимодействии иммунологических механизмов в процессе хронического воспаления. Цитокины обеспечивают выработку В-лимфоцитами специфических иммуноглобулинов различных классов.

В периферической крови больных со средней тяжестью заболевания отчетливо просматриваются изме-

нения в строении лимфоцитов. На мазках из лейкоцитарной пленки, полученной после центрифугирования периферической крови, при высоком содержании IL-1 обнаруживается увеличение в диаметре лимфоцитов в 3-4 раза (рис. 1 а, б). Соотношение между ядром и цитоплазмой изменяется, так как количество цитоплазмы становится больше по сравнению с обычным ее содержанием в лимфоцитах здоровых лиц. После окраски мазков метиловым фиолетовым четко выделяется общий план строения цитоплазмы – она приобретает мелковакуолистый план строения с большим содержанием мелкой зернистости (рис. 1 а, б).

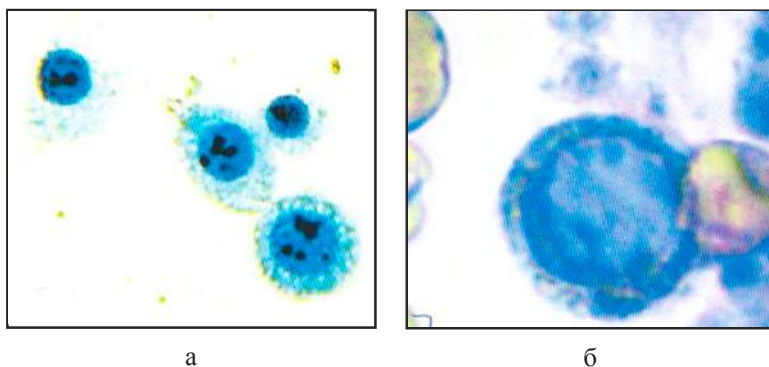


Рис. 1. Лимфоциты периферической крови у больных БА средней тяжести в период обострения заболевания.

а – по сравнению с лимфоцитами здоровых лиц, при БА в период обострения резко нарастает цитоплазма. Она становится мелковакуолистой. Окраска метиловым фиолетовым. Увеличение: 900.

б – в цитоплазме появляется зернистость. Окраска метиловым фиолетовым. Увеличение: 1350.

Вероятно, это связано с приобретением лимфоцитами свойств секреторной активности по выработке антител под влиянием антигенов, появляющихся в большом количестве у больных БА в период обострения заболевания.

В периферической крови, особенно у лиц со средней степенью тяжести БА, появляется до 3-4% нормальных киллеров. Большие зернистые лимфоциты (NK) выполняют цитотоксические функции, такие же, как и цитотоксические Т-лимфоциты – уничтожение инфицированных вирусом клеток.

Одной из обязанностей киллерных клеток является выявление и уничтожение клеток организма, зараженных вирусами. Нормальные киллеры у человека составляют около 5% лимфоцитов периферической крови. Чаще всего они имеют фенотип CD-3-CD-16+CD56+CD94 и неперестроенное расположение генов. Хотя они и относятся к лимфоидным клеткам, но лишены маркеров Т- и В-лимфоцитов. Они узнают высокомолекулярные гликопротеины, которые экспрессируются на мембранах инфицированных вирусом клеток. Сближение инфицированных клеток и NK-лимфоцитов происходит за счет рецепторов NK. При этом они активируются, и их содержимое выбрасывается во внеклеточное пространство. Главная роль здесь принадлежит цитолизину-перфорину. Перфорин встраивается в мембрану клетки-мишени и формирует трансмембранные поры. Клетка погибает, так как ее содержимое вытекает через эти поры. Гранулы NK выбрасывают протеинкиназы, которые функционируют как цитотоксические факторы. Токсические факторы начинают действовать на эпителий слизистой оболочки бронхов уже на ранних этапах формирования астмы.

Участки эпителиального покрова слизистой обо-

лочки при БА средней степени тяжести, вовлеченные в воспалительный процесс, подвергаются апоптозу клеток, расположенных в центре эпителия слизистой оболочки (рис. 2а). Это процесс нарастает по мере развития тяжести заболевания (рис. 2б).

По мере перехода БА от средней степени тяжести к тяжелой форме, в силу постоянного воспалительного процесса в бронхах трофика слизистой оболочки сильно нарушается. Это прежде всего связано с резким утолщением базальной мембраны слизистой оболочки, препятствующей диффузии питательного материала из кровеносных сосудов слизистой в сторону эпителия, а также действием провоспалительных интерлейкинов и биогенноактивных веществ, поскольку вблизи базальной мембраны и в самом эпителии появляется большое количество тучных клеток (рис. 3, 4).

Эпителиальный слой слизистой подвергается разрушению, на базальной мембране вначале остаются несколько слоев недифференцированных эпителиальных клеток (рис. 5), а в последующем при сильно выраженной тяжелой форме БА на базальной мембране остается только один слой эпителиальных клеток, зачастую находящихся в состоянии апоптоза (рис. 6, 7). Под базальной мембраной со стороны слизистой появляется большое количество нормальных киллеров. Последние находятся в большом количестве в зоне изменяющегося эпителия слизистой оболочки бронхов, особенно при затянувшейся тяжелой форме БА. Это четко подтверждается иммуногистохимическими реакциями на выявление NK (рис. 8). NK-лимфоциты вступают в контакт с эпителиальной мембраной слизистой, на которой в этих местах отмечается быстрое уничтожение оставшихся эпителиальных клеток (рис. 8, 9).

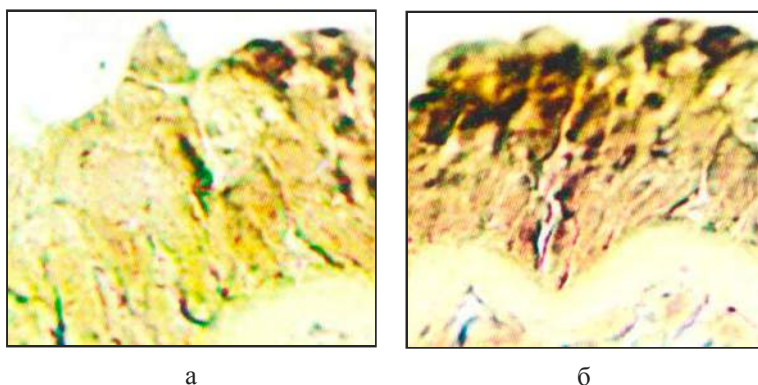


Рис. 2. Слизистая оболочка бронха.

а – БА средней тяжести. Эпителиальные клетки, как в центре пласта, так и ближе к поверхности, местами подвергаются апоптозу.

б – Тяжелая БА. Клетки эпителиального пласта подвергаются апоптозу в большом количестве. Базальная мембрана утолщена.

Иммуногистохимическая реакция на апоптоз. Увеличение: 10×40.

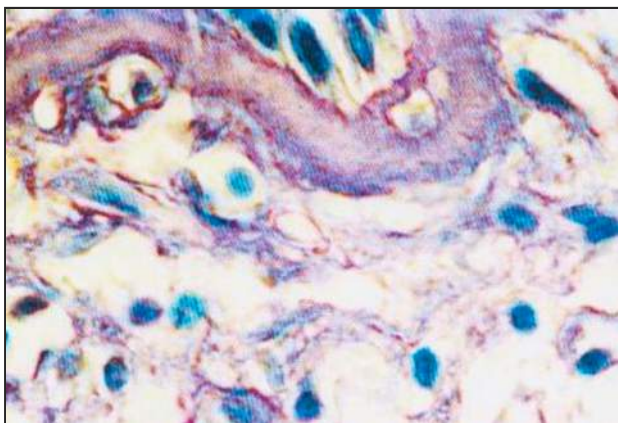


Рис. 3. Слизистая оболочка бронха больного тяжелой формой БА. В соединительной ткани вблизи базальной мембраны скапливается большое количество тучных клеток и лимфоцитов. Окраска – Азур I при pH 3,6. Увеличение: 10×40.

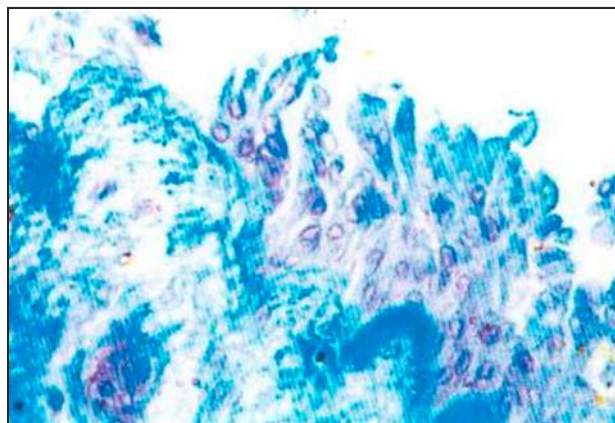


Рис. 4. Слизистая оболочка бронха больного тяжелой формой БА. Тучные клетки и лимфоциты в большом количестве проникают в эпителий слизистой. Окраска – Азур I при pH 3,6. Увеличение: 10×40.

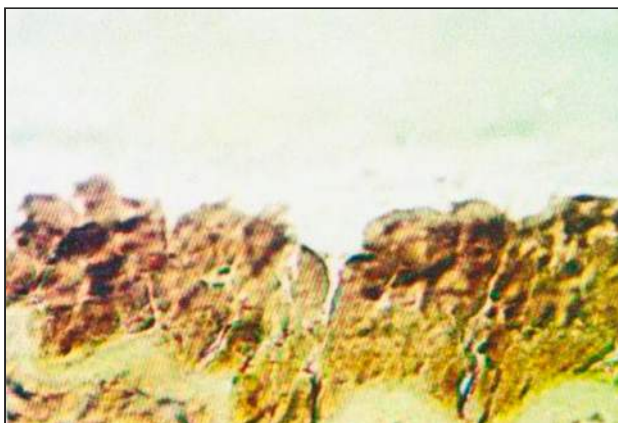


Рис. 5. Слизистая оболочка бронха больного тяжелой формой БА. Эпителиальный слой представлен на базальной мембране только несколькими слоями недифференцированных клеток. Большинство клеток находится в состоянии апоптоза. Иммуногистохимическая реакция на апоптоз. Увеличение: 10×40.

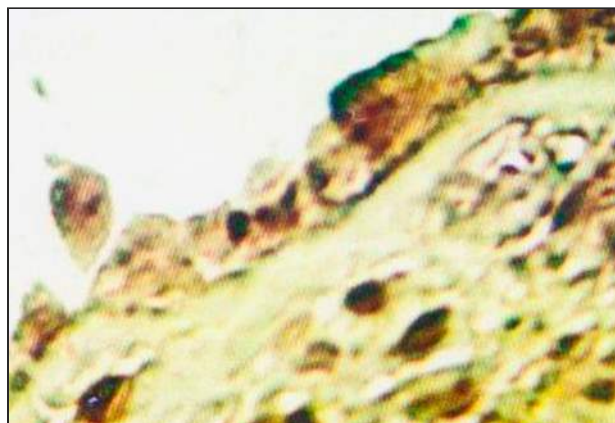


Рис. 6. Слизистая оболочка бронха больного тяжелой формой БА с длительным периодом заболевания. На базальной мембране слизистой находится только один слой эпителиальных клеток, большая часть которых в состоянии апоптоза. Иммуногистохимическая реакция на апоптоз. Увеличение: 10×40.

Затянувшееся хроническое воспаление при средне-тяжелой и тяжелой формах БА ведет к выраженным изменениям в соединительной ткани слизистой оболочки бронхов. В подавляющем большинстве эластические элементы соединительной ткани заменяются на грубоволокнистые, состоящие из пучков коллагеновых волокон (рис. 10). При этом соединительная ткань по своему содержанию начинает конкурировать с нарастанием гладких мышечных элементов. Последние занимают более 50% по отношению ко всей площади собственного слоя слизистой оболочки (рис. 11).

Заключение

Таким образом, БА, проявляющаяся длительным воспалительным процессом в слизистой оболочке

бронхов, претерпевает под влиянием провоспалительных интерлейкинов и биогенноактивных веществ динамические морфологические изменения в слизистой оболочке. На стадии средней и тяжелой степени тяжести заболевания эпителий слизистой под влиянием интерлейкинов и биогенноактивных веществ испытывает ферментативные изменения, в результате чего появляются очаги, представленные эпителиальными клетками в состоянии апоптоза, и по мере нарастания степени тяжести заболевания происходит разрушение эпителиального пласта слизистой бронха. На стадии тяжелого течения БА эпителий представлен однослойным недифференцированным эпителием, который подвергается разрушительному действию со стороны НК-лимфоцитов.

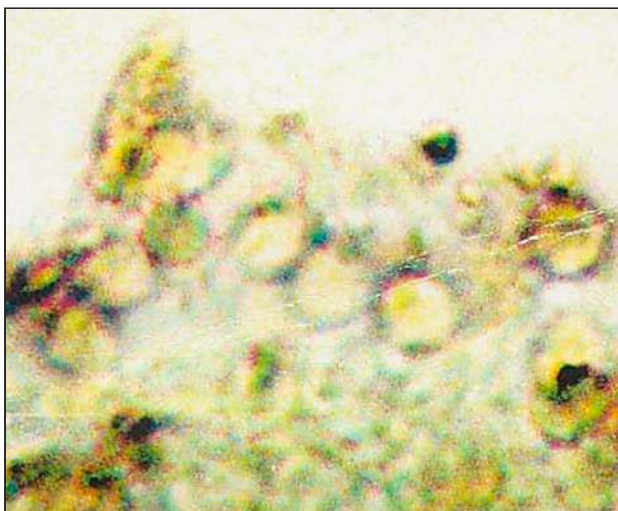


Рис. 7. Слизистая оболочка бронха больного тяжелой формой БА. Эпителиальный слой клетки в подавляющем большинстве находится в состоянии апоптоза. Иммуногистохимическая реакция на апоптоз. Увеличение: 10×40.



Рис. 8. Слизистая оболочка бронха больного тяжелой формой БА. Иммуногистохимическая реакция на НК. НК-лимфоциты тесно контактируют с мембраной слизистой оболочки, образуя перед собой лизируемое ими пространство. Увеличение: 10×100.

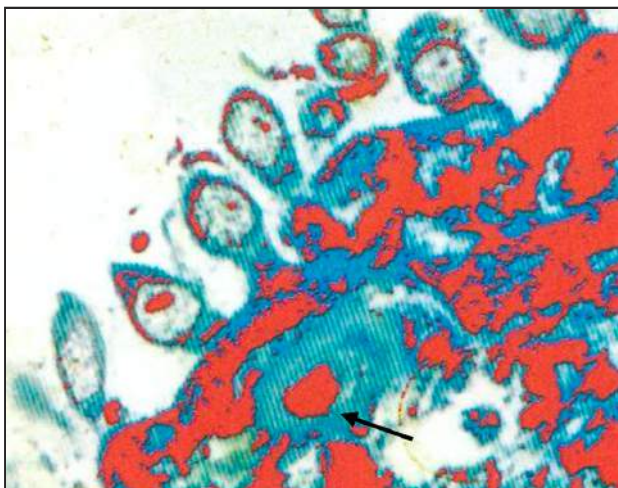


Рис. 9. Слизистая оболочка бронха больного, представленная на рисунке, обработана по программе Bio Vision. Эпителиальные клетки отторгаются, особенно в зоне нахождения НК (↑).



Рис. 10. Слизистая оболочка бронха больного БА средней степени тяжести. Эластические волокна, подвергающиеся деструкции. Окраска орсеином фирмы Мерск (по Лилли). Увеличение: 10×40.

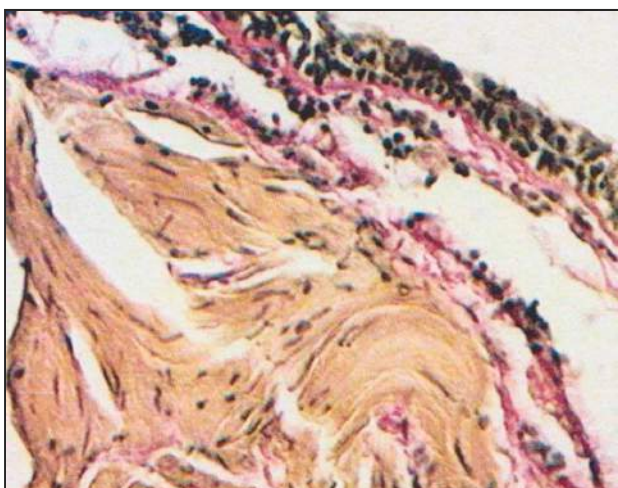


Рис. 11. Слизистая оболочка бронха больного БА средней степени тяжести, длительное течение. Резкое нарастание гладкомышечной ткани, заменяющей соединительную ткань. Окраска по Ван Гизону. Увеличение: 10×40.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бронхиальная астма / под ред. А.Г.Чучалина. М.: Агар, 1987. Т.1,2.
2. Княжеская Н.П. Бронхиальная астма: некоторые аспекты диагностики и лечения // *Consilium medicum*. 2001. Т.3, №12. С.575–579.
3. Кондрашова М.Н. Реципрокная регуляция дыхания и структурного состояния митохондрий гормонально-субстратной системой // Митохондрии, клетки и активные формы кислорода: материалы междунар. конф. Пушино, 2000. С.71–74.
4. Механизмы влияния атмосферных загрязнений на течение заболеваний («Ангарская» бронхиальная астма) / М.Т.Луценко [др.] // Пульмонология. 1992. №1. С.6–10.
5. Луценко М.Т. Морфофункциональная характеристика фетоплацентарного барьера при герпес-вирусной инфекции // Вестник ДВО РАН. 2004. №3. С.155–166.
6. Луценко М.Т. Морфофункциональная характеристика органов дыхания в зависимости от экологических условий окружающей среды // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2006. Вып.22. С.33–36.
7. Одиреев А.Н., Колосов В.П., Сурнин Д.Е. Диагностика мукоцилиарной недостаточности у больных хронической обструктивной болезнью лёгких // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2006. Вып.23 (приложение). С.47–50.
8. Нарушения мукоцилиарного клиренса при бронхиальной астме / А.Н.Одиреев [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2010. Вып.37. С.15–21.
9. Капиллярный кровоток в легких у больных среднетяжелой бронхиальной астмой на фоне стандартной базисной терапии / А.Б.Пирогов [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2004. Вып.17. С.29–34
10. Одиреев А.Н., Андриевская И.А., Луценко М.Т. Вклад изменений в системе медиаторов воспаления в формирование мукоцилиарной недостаточности у больных бронхиальной астмой // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2008. Вып. 29. С.18–21.

11. Чучалин А.Г. Актуальные вопросы пульмонологии // Рус. мед. журн. 2000. Т.8, №17. С.727–730.
12. Чучалин А.Г. Тяжелые формы бронхиальной астмы // Тер. архив. 2001. Т.73, №3. С.5–9.
13. Чучалин А.Г. Белая книга. Пульмонология // Пульмонология. 2004. №1. С.7–34.

REFERENCES

1. Chuchalin A.G, editor. *Bronkhial'naya astma* [Bronchial asthma]. Moscow: Agar; 1987.
2. Knyazheskaya N.P. *Consilium medicum* 2001; 3(12):575–579.
3. Kondrashova M.N. *Mitokhondrii, kletki i aktivnyye formy kisloroda: materialy mezhdunarodnoy konferentsii* [Mitochondria, cells and reactive oxygen species: proceedings of the International Conference]. Pushchino; 2000:71–74.
4. Lutsenko M.T., Tseluyko S.S., Manakov L.G., Kolosov V.P., Perelman J.M. *Pul'monologiya* 1992; 1:6–10.
5. Lutsenko M.T. *Vestnik Dal'nevostochnogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk* 2004; 3:155–166.
6. Lutsenko M.T. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2006; 22:33–36.
7. Odireev A.N., Kolosov V.P., Surnin D.E. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2006; 23(Suppl.):47–50.
8. Odireev A.N., Zhou X.D., Li Q., Kolosov V.P., Lutsenko M.T. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2010; 37:15–21.
9. Pirogov A.B., Luk'yanov I.N., Odireev A.N., Tyurikova T.I. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2004; 17:29–34.
10. Odireev A.N., Andrievskaya I.A., Lutsenko M.T. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2008; 29:18–21..
11. Chuchalin A.G. *Russkiy meditsinskiy zhurnal* 2000; 8(17):727–730.
12. Chuchalin A.G. *Terapevticheskii arkhiv* 2001; 73(3):5–9.
13. Chuchalin A.G. *Pul'monologiya* 2004; 1:7–34.

Поступила 25.07.2014

Контактная информация
Михаил Тимофеевич Луценко,

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при НЗЛ,
Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: Lucenkomt@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Mikhail T. Lutsenko,

MD, PhD, Professor, Academician RAMS, Head of Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery Processes of the Respiratory System at Non-Specific Lung Diseases,
Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration SB RAMS,
22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: Lucenkomt@mail.ru