

УДК 616.248+616.233-002(616-001.18/.19):615-831.6+615.835.5

В.А.Доровских, Н.П.Красавина, С.С.Целуйко

МУКОЦИЛИАРНЫЙ КЛИРЕНС ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ НЕДОКРОМИЛА НАТРИЯ И ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ В КЛИНИКЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ*ГОУ ВПО Амурская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ***РЕЗЮМЕ**

Комплекс проведенных исследований позволяет объективно оценить положительный эффект воздействия на мукоцилиарный клиренс недокромила натрия и инфракрасного лазерного облучения при хронических обструктивных заболеваниях легких. Инфракрасный лазер является фактором, усиливающим миграционную активность тучных клеток. Своевременная коррекция свободно-радикального окисления липидов способствует снижению интенсивности патологических процессов в органах дыхания.

Ключевые слова: бронхиальная астма, хронический обструктивный бронхит, низкие температуры, недокромил натрия, инфракрасный лазер, мукоцилиарный клиренс, тучные клетки, бронхоальвеолярный лаваж.

SUMMARY

V.A.Dorovskikh, N.P.Krasavina, S.S.Tseluyko

RESPIRATORY MUCOCILIARY CLEARANCE AGAINST A BACKGROUND OF NEDOCROMIL SODIUM ACTION AND LASER IRRADIATION IN CLINIC AND EXPERIMENT

The complex of the researches allows to estimate objectively nedocromil sodium and infra-red laser irradiation influence positive effect on mucociliary clearance in chronic obstructive pulmonary diseases. The infra-red laser is the factor strengthening migratory activity of mast cells. Timely correction of lipids free radical oxidation contributes to depression of pathological processes intensity in respiratory organs.

Key words: bronchial asthma, chronic obstructive bronchitis, low temperatures, nedocromil sodium, infra-red laser, mucociliary clearance, mast cells, bronchoalveolar lavage.

Хронические обструктивные болезни лёгких включают гетерогенную по своей природе группу лёгочной патологии (бронхиальная астма, хрониче-

ский обструктивный бронхит и др.) и фактически являются следствием комбинации воспалительных заболеваний воздухоносных путей и энзиматической деструкции лёгочной паренхимы. В структуре заболеваемости данная патология входит в число лидирующих по количеству дней нетрудоспособности, причинам инвалидности и занимают 4-5 место среди прочих причин смерти [7, 9]. Длительный период заболевание протекает с минимальными клиническими признаками болезни и, как правило, диагностируются на стадии обострения, что обычно проявляется нарушениями проходимости бронхов. Очищение воздухоносных путей осуществляется за счет работы мукоцилиарного аппарата, таким образом, изучение лаважной жидкости даёт прямое представление о патологических процессах, протекающих в органах дыхания [2, 9]. Воспаление, как результат интенсификация кислородного режима клетки служит непосредственным фактором увеличения в тканях инициаторов перекисного окисления. Низкие температуры позволяют моделировать ряд синдромов, возникающих при заболевании органов дыхания. Холодовое повреждение провоцирует усиление реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) и является одним из ведущих в структурных изменениях тканей лёгкого [4].

В настоящее время не существует методов лечения, которые бы предотвратили прогрессирование обструкций воздухоносных путей, и весь имеющийся спектр методов лечения на сегодня не приносит видимых результатов больному. Сегодня ученые всего мира разрабатывают и апробируют большой ряд препаратов, которые могут быть весьма эффективными при лечении заболеваний лёгких. Но это не должно исключать возможность комбинированного применения уже известных препаратов, а также изменения методики их введения. Большие надежды в изучении проблемы хронических обструктивных заболеваний лёгких связывают с разработкой биомаркеров, то есть количественно определяемых параметров, которые могут быть использованы для характеристики здоровья, диагностических критериев заболеваний и оценки результативности терапии.

Эффективность лазерной терапии доказана на практике и не вызывает сомнений, но в то же время механизмы действия остаются мало исследованными. Известно, что лазерное облучение способствует нормализации реакции ПОЛ и улучшению микроциркуляции органа, при этом для воздействия на глубоко лежащие ткани инфракрасное лазерное излучение по совокупности характеристик является универсальным [3, 8]. *Недокромил натрия* – нестероидный противовоспалительный препарат, ингибирует высвобождение биологически активных веществ из тучных клеток, важной функциональной особенностью которых является способность накапливать, синтезировать и секретировать большой спектр биологически активных веществ, участвующих в регуляции межклеточных взаимоотношений [13, 14, 15].

Целью работы была разработка критериев, позволяющих оценить работу мукоцилиарного аппарата и его восстановление при патологии органов дыхания на клиническом и экспериментальном материале на фоне применения препарата противовоспалительного действия и облучения инфракрасным лазером.

Материал и методы исследования

Клиническая часть работы проведена на 47 пациентах (32 мужчины и 15 женщин) в возрасте от 22 до 58 лет, находящихся на лечении в Амурской областной клинической больнице. У больных с диагнозом хронический обструктивный бронхит и бронхиальная астма средней степени тяжести исследовали бронхобиопсию и жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). При отборе больных для проведения бронхоскопии за основу были взяты рекомендации Европейского Респираторного общества.

У всех больных, поступающих в клинику, эндоскопически регистрировали катарально-гнойное воспаление или двухсторонний диффузный эндобронхит. После проведенного в течение 10-14 дней лечения у данных пациентов повторно брали биопсию и бронхоальвеолярный лаваж. У 15 больных с хроническим обструктивным бронхитом на фоне общей терапии применяли лазерное облучение импульсным терапевтическим аппаратом АЛТ “Узор”, длина волны излучателя $0,89 \pm 0,02$ мкм. Время одной процедуры 5 минут, число процедур от 3 до 10 (до восстановления нормальной картины бронхиального дерева). У 15 больных с диагнозом бронхиальная астма средней степени тяжести в качестве лечения использовали только недокромил натрия вводимый различными путями: ингаляционно 3-4 раза в день по 4 мг и эндобронхиально – орошение водным раствором *недокромилла натрия* по методике С.И.Ткачёвой (1995), общекурсовая доза 8-12 мг. 17 больным с диагнозом бронхиальная астма средней степени тяжести базисная терапия проведена с применением препарата ингаляционно 3-4 раза в день по 4 мг; эндобронхиальное орошение водным раствором дыхательных путей, общая доза 8-12 мг в сочетании с эндобронхиальной лазеротерапией (по выше описанной методике).

Экспериментальное исследование было проведено на крысах, охлаждение которых проводили в климатической камере (тип 3001 “ILKA”, Германия) при

температуре 15°C в течение 15 дней по 3 часа ежедневно. Другим группам животных (2, 3, 4) применяли методы терапии на фоне действия низких температур, до помещения в климатическую камеру для охлаждения. Вторая группа животных получила в течение 15 дней недокромил натрия, который вводили в виде аэрозолей в дозе 0,05-0,1 мг на 100 г массы. Третью группу животных в течение 15 дней ежедневно облучали в области грудной клетке импульсным инфракрасным лазером, аппарат “Agnis-L01” с длиной волны 0,85-0,9 мкм, суммарная доза воздействия составила 7,8 Дж/см². Четвёртая группа животных получила в течение 15 дней недокромил натрия и их ежедневно облучали импульсным инфракрасным лазером (по выше описанной методике).

Морфологическое исследование материала началось с фиксации различных отделов трахеи и легкого в 10% нейтральном формалине и спирт-формоловой смеси, получении парафиновых срезов, с последующей окраской различными красителями. Общий план строения изучен после окраски гематоксилином Бемера-эозином. Выявление гликозаминогликанов осуществляли альциновым синим 8 GX по Стивдману (Steedman, 1950) с контрольной обработкой срезов в растворе тестикулярной гиалуронидазы. Нейтральные полисахариды выявляли ШИК-реакцией по Мак-Манусу (1954), с контрольной обработкой срезов альфа-амилазой.

Биопсии больных, полученные из клиники и материал экспериментальных исследований на крысах обрабатывали для трансмиссионной микроскопии (электронный микроскоп Tecnai G2 Spirit TWIN, Голландия) по методу Coalson, Winteret et al. (1986), с целью получения полутонких и ультратонких срезов.

Морфометрическое изучение включало подсчет числа тучных клеток в эпителии каудального отдела трахеи и долевого бронха на 100 мкм длины эпителиального пласта.

В жидкости БАЛ больных определяли нейраминные кислоты (сиаловые) по методу Свеннерхольма (Svennerholm L., 1958) в модификации Миеттинена (Miettinen T., 1959) и общий белок биуретовым методом стандартного набора БиоТест Лахема БРНО. Уровень реакции перекисного окисления определяли в жидкости БАЛ и ткани лёгкого крыс следующими методами: диеновые конъюгаты измеряли при длине волны 233 нм с ходом луча 10 мм в результате появления нового максимума в спектре поглощения при образовании свободных радикалов (И.Д.Стальная, 1972), гидроперекиси липидов выявляли по их способности окислять ионы Fe³⁺ с тиоцианатом аммония (Л.А.Романова, И.Д.Стальная, 1977 в модификации Е.А.Бородин, 1992), витамин Е в липидных экстрактах ткани по цветной реакции с дипиридиллом и FeCl₃ (Р.Ж.Киселевич, С.И.Скварко, 1972).

Результаты исследования и их обсуждение

Независимо от генеза воспалительного процесса в легких (хронический обструктивный бронхит или бронхиальная астма), в органах дыхания развивается стереотипный комплекс неспецифических изменений. В собственной пластинке слизистой возрастает число различных по размеру и форме тучных клеток

и в ряде случаев, особенно у больных бронхиальной астмой, наблюдаются частичное или полное разрушение их мембраны и выход гранул в окружающую ткань. Появление биологически-активных веществ в соединительной ткани создает условия для активации воспалительного процесса. В составе эпителиального пласта увеличивается количество мигрирующих тучных клеток (табл. 1). Известно, что тучные клетки являются одними из инициаторов воспаления, поэтому выход большого количества биологически активных веществ в толще эпителия оценивается как неблагоприятный фактор [1, 11]. В зоне локализации “светлых” эпителиоцитов обнаруживаются многочисленные крупные, базофильно окрашенные гранулы тучных клеток – это результат их дегрануляции и частичного разрушения. Возникающая деструкция эпителия приводит к гиперреактивности дыхательных путей за счет увеличения проницаемости слизистой оболочки бронхов. Изучение жидкости БАЛ показало, что в период обострения у больных с хроническими обструктивными заболеваниями легких регистрируется значительное повышение содержания общего белка до $9,92 \pm 1,19$ мг/мл при бронхиальной астме и $10,43 \pm 1,34$ мг/мл при хроническом бронхите (табл. 1). Это может быть связано с поступлением белков крови путём экссудации и трансудации, а также как результат дегенерации и распада собственных тканей и микроорганизмов.

Применение в качестве терапии эндобронхиально инфракрасного лазерного излучения у больных хроническим обструктивным бронхитом и комбинированной терапии у больных бронхиальной астмой приводят к достоверному снижению показателя общего белка. Это можно рассматривать как объективный критерий, свидетельствующий о снижении интенсивности воспалительного процесса за счёт уменьшения экссудации белков крови и явлений деструкции собственных тканевых структур. Известно, что сиаловые кислоты имеют большое значение в повышении защитной функции эпителия и по мере роста этого показателя в бронхиальном секрете снижается интенсивность выделения микроорганизмов.

Полученные нами результаты позволили выявить, что на фоне проведённой терапии у больных содержание сиаловых кислот несколько повышалось и, хотя среднестатистические показатели не имеют достоверности, т.е. основания предположить, что данный показатель свидетельствует о восстановлении обменных процессов в слизистой оболочке бронхов [8].

Снижение интенсивности воспалительного процесса в слизистой оболочке сопровождается уменьшением числа “светлых” клеток и восстановлением реснитчатого эпителия. Резко возрастает миграция тучных клеток через эпителиальный пласт, их число колеблется от 4,32 до 7,6 на 100 мкм длины эпителиального пласта (табл. 1). Мигрирующие через реснитчатый эпителий тучные клетки сохраняют большое количество гранул в своей цитоплазме, кроме этого среди них очень редко регистрируются явления дегрануляции. Это позволяет предположить, что инфракрасный лазер является фактором, стабилизирующим структуру мембран самих тучных клеток и их гранул, что в свою очередь препятствует выходу биологически активных веществ, которые могут вызвать повреждение эпителиального барьера. Таким образом, в ходе повышенной миграции тучных клеток на фоне лазерного облучения, соединительная ткань освобождается от элементов провоцирующих и поддерживающих активность воспалительного процесса [5, 6, 11].

Изучение БАЛ даёт дополнительную и важную информацию об уровне изменений в органах дыхания. Более достоверные данные получены в тех случаях, когда проводилось исследование бронхобиопсий на полутонких срезах в сочетании с электронно-микроскопическим методом, что значительно расширяет представление о состоянии слизистой бронхиального дерева и мукоцилиарного клиренса при патологии и особенно в оценке эффективности проводимой терапии.

Анализ влияния экологических факторов Дальневосточного региона показал, что особое значение при этом имеют низкие температуры, которые вызывают

Таблица 1

Биохимические показатели жидкости БАЛ и морфометрические данные биопсий больных хроническим обструктивным бронхитом и бронхиальной астмой до и после лечения

Группы	Показатели	Общий белок, мг/мл	Сиаловая кислота, ммоль/л	Число тучных клеток в эпителии (на 100 мкм длины пласта)
Больные бронхиальной астмой	До лечения	$8,92 \pm 1,19$	$0,66 \pm 0,12$	$2,55 \pm 0,23$
	После лечения ингаляцией <i>недокромила натрия</i>	$6,66 \pm 1,62$	$0,55 \pm 0,16$	$4,35 \pm 0,31^*$
	После лечения ингаляцией <i>недокромила натрия</i> и облучения лазером	$5,63 \pm 1,75^*$	$0,76 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,34^*$
Больные хроническим бронхитом	До лечения	$10,43 \pm 1,34$	$0,61 \pm 0,18$	$2,95 \pm 0,28$
	После лечения и облучения лазером	$7,99 \pm 1,12^*$	$0,79 \pm 0,12$	$7,6 \pm 0,37^*$

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению показателей данного ряда и ряда больных до лечения; p – степень достоверности.

чрезмерное повышение интенсивности реакций перекисного окисления липидов и снижение антиоксидантной защиты [2, 4]. Весь комплекс морфологических изменений в лёгких при охлаждении характерен для стадии адаптивного напряжения, при котором возникают выраженные деструктивные изменения эпителия дыхательных путей и нарушение работы мукоцилиарного аппарата. На поверхности эпителиального пласта возрастает количество бронхиального секрета, в его составе выявляется высокое содержание гликозаминогликанов и ШИК-позитивных веществ.

При действии низкой температуры на организм значительно повышается интенсивность реакций ПОЛ почти на всех уровнях, о чем свидетельствует достоверное увеличение гидроперекиси в жидкости БАЛ до $21,8 \pm 0,73$ нмоль/мл, в ткани легкого до $22,4 \pm 0,51$ нмоль/г и снижение витамина Е в жидкости БАЛ до $1,86 \pm 0,1$ мкг/мл (табл. 2).

Данные, иллюстрирующие приспособление организма к общему охлаждению, были получены при применении лазерного облучения, как ингибитора процессов перекисного окисления липидов. Наиболее эффективно было комбинированное применение ингаляций *недокромила натрия* и облучение инфракрасным лазером при общем охлаждении. Данную точку зрения подтверждают результаты, полученные при изучении жидкости БАЛ и ткани легкого, в которых выявлено снижение количества гидроперекисей и значительное повышение уровня витамина Е в жидкости БАЛ (табл. 2). Известно, что витамин Е является антиоксидантом, который взаимодействует с активными формами кислорода, обрывая цепь реакции перекисного окисления липидов [4].

Действие низких температур приводит к увеличению миграции тучных клеток через эпителий, так их число в каудальном отделе трахеи повышается до $3,2 \pm 0,71$; в долевого бронхе до $2,7 \pm 0,52$ (табл. 3). По всей видимости, этот механизм является универсальным и обеспечивает регуляцию мукоцилиарно-

го клиренса функционально отживших эпителиальных клеток. Остается неясным, что же влияет на повышение миграционной активности тучных клеток в условиях холодного воздействия. По всей видимости, в условиях эксперимента это обусловлено повышенным распадом тканевых структур, накоплением продуктов метаболизма, то есть появлением избытка деструктивных белков выполняющих функцию тканевых антигенов. Активная дегрануляция тучных клеток в эпителии которую мы отметили после действия холодного фактора, приводит не только к секреции гранул, но и к полному их разрушению. При этом освобождается большое количество биологически-активных веществ, способных вызвать повреждение эпителиального барьера, изменить функциональную активность клеток и таким образом, создать условия для проникновения антигенов бронхиального содержимого под эпителий. Применение инфракрасного лазерного облучения на фоне общего охлаждения позволило выявить характерную однотипную реакцию тучных клеток различных отделов дыхательных путей, независимо от места воздействия лазера. Так число тучных клеток в каудальном отделе трахеи возрастает до $6,0 \pm 0,83$; в долевого бронхе до $4,97 \pm 0,72$ (табл. 3). При обычных ситуациях миграция клеток в эпителии, по всей видимости, идет по каналам, сформированным в определенных зонах и этот процесс регулируемый. В условиях патологии тучные клетки, вероятно, начинают мигрировать в различных участках, нарушая при этом взаимосвязь между эпителиоцитами и усиливая структурную перестройку эпителиального пласта. Учитывая, что тучные клетки обладают впервые выявленной нами высокой фото-активностью, применение лазерной терапии стимулирует их миграционные процессы. Повышение миграции тучных клеток при облучении инфракрасным лазером в данном случае связано с передачей информационного воздействия через жидкую среду, которая преобладает в рыхлой соединительной ткани, либо информация излучения

Таблица 2

Биохимические показатели жидкости БАЛ и ткани лёгкого у интактных и экспериментальных крыс

Показатели	Интактные животные	Охлаждение 15 дней			
		15 дней охлаждения	Ингаляции <i>недокромила натрия</i>	Облучения лазером	Ингаляции <i>недокромила натрия</i> и облучения лазером
<i>В жидкости БАЛ</i>					
Диеновые конъюгаты, нмоль/мл	64,8±1,02	60,0±3,19	61,0±1,1	54,0±1,14**	56,0±1,1
Гидроперекиси, нмоль/мл	3,5±0,07	21,8±0,73*	14,1±1,12**	11,0±0,57**	6,5±0,27**
Витамин Е, мкг/мл	2,95±0,41	1,96±0,1*	7,35±0,27**	14,7±0,55**	4,66±0,09**
<i>В ткани лёгкого</i>					
Диеновые конъюгаты, нмоль/г	53,68±0,41	73,6±0,84*	50,7±0,84**	50,9±1,33**	63,01±0,68**
Гидроперекиси, нмоль/г	12,12±0,33	22,4±0,51*	21,4±0,55	19,6±0,51**	16,42±0,51**

Примечание: здесь и далее * – $p < 0,05$ по сравнению показателей данного ряда и ряда интактных животных, ** – $p < 0,05$ по сравнению показателей данного ряда и ряда животных 15 дней охлаждения.

Таблица 3

**Число тучных клеток в эпителии органов дыхания у интактных и экспериментальных крыс
(на 100 мкм эпителиального пласта)**

Объект	Интактные животные	Охлаждение 15 дней			
		15 дней охлаждения	Ингаляции недокромила натрия	Облучения лазером	Ингаляции недокромила натрия и облучения лазером
Каудальный отдел трахеи	1,2±0,25	3,2±0,71*	3,2±0,25	6,0±0,83**	3,67±0,5
Долевой бронх	0,51±18	2,7±0,52*	2,3±0,98	4,97±0,72**	4,02±0,67**

передаётся через биологически активные точки и меридианы.

Задачи современной медико-биологической науки состоят не столько в объяснении и морфологическом обосновании явления, а в расшифровке механизма регуляции, без чего невозможно осуществлять управление любым процессом [10, 12]. Полученные данные позволяют судить не только о функциональных нарушениях, связанных с активацией гуморальных факторов воспаления, но и о морфологических изменениях возникающих в легких в условиях патологии и на фоне терапии. Комплекс проведенных нами исследований на морфологическом, морфометрическом и биохимическом уровнях позволяет достаточно объективно оценить положительный эффект комбинированного воздействия на мукоцилиарный клиренс недокромила натрия и инфракрасного лазерного облучения при хронических обструктивных заболеваниях легких и при экспериментальном общем охлаждении организма. Инфракрасный лазер является фактором, усиливающим миграционную активность тучных клеток. Своевременная правильная коррекция свободно-радикального окисления липидов способствует снижению интенсивности патологических процессов в органах дыхания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быков В.Л. Секреторные механизмы и секреторные продукты тучных клеток // Морфология. 1999. №2. С.64–72.
2. Камышников В.С., Колб В.Г., Ломако М.Н. Липидный обмен при неспецифических заболеваниях лёгких // Советская медицина. 1984. №10. С.3–7.
3. Козлов В.И. Современные направления лазерной медицины // Лазерная медицина. 1997. Т.1, В.1. С.6–2.
4. Красавина Н.П., Целуйко С.С. Тучные клетки органов дыхания и перспективы их изучения (Обзор литературы) // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2004. Вып.19. С.74–79.

5. Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. Новосибирск: Наука; Сибирское отделение, 1988. 192 с.

6. Лазеры в клинической медицине. Руководство для врачей // под ред. Плетнёва С.Д. М.: Медицина, 1996. 432 с.

7. Мотавкин П.А., Гельцер Б.И. Клиническая и экспериментальная патофизиология лёгких. Москва: Наука, 1998. 366 с.

8. Осин А.Я., Ицкович А.И., Гельцер Б.И. Лазерная терапия в пульмонологии. Владивосток: Дальнаука, 1999. 222 с.

9. Респираторная медицина / под ред. А.Г.Чучалина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. Т1. С.23-338.

10. Целуйко С.С., Красавина Н. П., Корнеева Л.С. Анализ морфометрических показателей биоптатов бронхов у больных с заболеваниями органов дыхания // Информатика и системы управления. 2008. №2(16). С.181–183.

11. Яглов В.В., Лоцилов Ю.А. Эндокринный аппарат дыхательной системы и перспективы его изучения (обзор литературы) // Гигиена труда и профессиональных заболеваний. 1988. №6. С.38–41.

12. Kiernan J.A. Degranulation of mast cells in the trachea and bronchi of the rat following stimulation of the vagus nerve // Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 1990. Vol.91, №4. P.398–402.

13. Oseid S., Nellbye E., Hem E. Effect of nedocromil sodium on exercise - induced bronchoconstriction exacerbated by inhalation of cold air // Scand. J. Med. Sci. Sports. 1999. Vol.5, №2. P.88–93.

14. Rainey D.K. Nedocromil sodium (Tilade): a review of preclinical studies // Eur. Respir. J. Suppl. 1989. Vol.6. P.561–565.

15. Activity of nedocromil sodium in mast cell dependent reactions in the rat / Riley P.A. [et al.] // Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 1987. Vol.82, №1. P.108–110.

Поступила 09.06.2009

Владимир Анатольевич Доровских, ректор АГМА, зав. кафедрой фармакологии,
675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95;
Vladimir A. Dorovskikh,
95, Gorkogo Str., Blagoveshchensk, 675000;
E-mail: agma@amur.ru