

реф. дис. ... канд. мед. наук. Иркутск, 1996. 15 с.

10. Ульянычев Н.В. Автоматизированная система для научных исследований в области физиологии и патологии дыхания человека. Новосибирск: ВО Наука, 1993. 246 с.

11. Budesonide / formoterol for maintenance and relief in uncontrolled asthma vs. high-dose salmeterol / fluticasone / Bousquet J. [et al.] // *Respir. Med.* 2007. Vol.101. P.2437–2446.

12. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study / Bateman E.D. [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004. Vol.170. P.836–844.

13. James A. Airway remodeling in asthma // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2005. Vol.11, №1. P.1–6.

14. Nathan R.A., Bernstein J.A., Bielory L. Zafirlukast improves asthma symptoms and quality of life in patients with moderate reversible airflow obstruction // *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998. Vol.102. P.935–942.

15. Byrne P.M.O. Leukotrienes in the pathogenesis of asthma // *Chest.* 1997. Vol.111. P.27–34.

16. Ten Hacken N.H.T., Postma D.S., Timens W. Airway remodeling and long-term decline in lung function in asthma // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2003. Vol. 9. P.9–14.

Поступила 27.10.2008

Андрей Николаевич Одирев, старший научный сотрудник,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22;
Andrey N. Odireev,
22 Kalinin Str., Blagoveshchensk, 675000;
E-mail: cfpd@amur.ru



УДК 611-018.73(616.233-088.9+616.248)-08:615.234

М.М.Луценко, М.Т.Луценко

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕТАХРОМАЗИИ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ БРОНХОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ АКОЛАТОМ

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАН, Благовещенск

РЕЗЮМЕ

Применён метод метакроматического окрашивания слизистой бронхов у лиц с бронхиальной астмой до и после лечения аколлатом. Выявлено, что при бронхиальной астме (особенно тяжелого течения) в слизистой оболочке накапливается большое количество интраэпителиальных лимфоцитов, в клеточной мембране которых выявляется интенсивная реакция на сialовые кислоты. После курса лечения больных аколлатом резко снижается как количество лимфоцитов в слизистой оболочке бронхов, так и реакция на сialовые кислоты в их клеточных мембранах.

Ключевые слова: бронхиальная астма, гистохимия бронхов, слизистая, аколлат.

SUMMARY

M.M.Lutsenko, M.T.Lutsenko

HISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF METACHROMASIA IN BRONCHIAL MUCOSA IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA BEFORE AND AFTER TREATMENT WITH ACCOLATE

Metachromatic staining procedure was used to study bronchial mucosa in patients with bron-

chial asthma before and after treatment with accolate. Patients with severe bronchial asthma had a great number of intraepithelial lymphocytes accumulated in bronchial mucosa. Their cellular membranes showed intense reaction to sialic acids. Patients who underwent treatment with accolate demonstrated reduced number of lymphocytes in bronchial mucosa as well as decreased reaction to sialic acids in their cellular membranes.

Key words: bronchial asthma, bronchus histochemistry, bronchial mucosa, accolate.

Метакромазия отражает структурно-молекулярные проявления в живых системах организма, формирующиеся под влиянием физико-химических процессов, как в норме, так и патологических состояниях. Прежде всего, в силу меняющихся условий гомеостаза, одни и те же тканевые структуры могут временно принимать полимерный, димерный или сохранять мономерный молекулярный физико-химический план строения как простых, так и сложных белков и полисахаридов. В ходе физико-химических трансформаций меняется взаимное расположение зарядных компонентов структурных образований. Ведущая роль отводится в этом плане в полисахаридах SO_3H , COOH , PO_4 -группам. Мета-

хромазию легче получить, если субстрат находится в состоянии геля. В уплотненных гелях наблюдается более отчетливая γ -метахромазия (красный оттенок). Димерная форма полимеризации (β -форма) обладает фиолетовой окраской. На уровне α -мономерной формы организации субстрата преобладает синее окрашивание [1, 2, 3, 4, 10, 11].

Метахромазия начинает проявляться в том случае, когда зарядные группы в результате полимеризации начинают сближаться. Если расстояние между зарядными группами 10,3 Å, метахромазия не обнаруживается. Такой характеристикой обладает, например, гиалуроновая кислота. По мере сближения зарядных групп начинают появляться признаки метахромазии. При расположении зарядных групп в пределах 5 Å друг от друга наблюдаются нестойкие оттенки метахромазии. Если добавить на каждый дисахарид от двух до трех SO_3H групп, метахромазия приобретает устойчивый характер, а расстояние между зарядными группами уменьшается до 4 Å. Для такой метахромазии характерен спектр 520–540 м?. Максимум поглощения для различных составляющих гликозаминогликанов различен: хондроитинсульфаты – 540 м?, гиалуроновая кислота – 480 м? [1, 2, 4, 5, 7].

Наиболее специфичными компонентами живых клеток являются биополимеры. Образование и химическая модификация этих гигантских молекул и их участие в катаболизме происходят в пределах одной и той же клетки. Изменения, которым полимеры подвергаются в клетке, играют важную роль в регуляции метаболизма. Внутри клеток осуществляется непрерывный поток материи, обуславливающий постоянное обновление компонентов, из которых они построены. Этот поток определяется необратимыми перестройками полимеров, включая их окончательный гидролиз. Белки и другие компоненты клеток модифицируются при помощи метилтрансфераз, которые переносят метильные группы от S-аденозилметионина к специфическим участкам в полимерах. Метилированные аминокислоты были обнаружены в гистонах, мышечных белках, цитохроме C. Перенос метильных групп может осуществляться на карбоксильные группы белковых цепей. Образующиеся при этом метиловые эфиры неустойчивы к гидролизу.

Более важным по сравнению с метилированием белков является метилирование нуклеиновых кислот. Молекулы т-РНК после синтеза подвергаются интенсивному метилированию и модификациям. Адениновые кольца могут метилироваться по N-1 атому или по $-\text{NH}_2$ -группе. Метилированию подвергаются урациловые, цитозиновые и гуаниловые основания.

При изучении любого белка, играющего определенную роль в функционировании организма, мы сталкиваемся с генетическим регулированием его синтеза и работы. Большая роль в организме отводится соединительной ткани и процессам её функционирования – как в норме, так и при патологических процессах. Особую роль в структуре соединительной ткани играет коллаген [6, 8, 9].

В клетке нет ничего остаточного. Структуры постоянно создаются и снова разрушаются, все с большей или меньшей скоростью подвергаются взаимо-

превращению. Гидролитические ферменты атакуют все полимеры, из которых состоят клетки, а активные катаболические реакции разрушают образующиеся в результате таких атак мономеры. Мембранные структуры также подвергаются изменениям в результате гидроксирования и гликозилирования. Эти реакции – источник движущей силы, обеспечивающей перемещение материала, образующего в результате распада мембран, на наружную поверхность клетки. В то же время другие процессы, включая процессы распада под действием лизосомальных ферментов, дают возможность материалу, из которого строятся мембраны, вновь проникать в клетку.

Окислительные процессы приводят к разрушению веществ гидрофобной природы, таких как стерин и жирные кислоты мембранных липидов, к их превращению в более легко растворимые вещества, которые затем распадаются и подвергаются полному окислению.

Любой фактор, влияющий на скорость биосинтеза или распада любого компонента клетки, должен оказывать прямое или опосредованное воздействие.

Материалы и методы исследования

Обследовано 90 больных бронхиальной астмой, находящихся на стационарном лечении в пульмонологическом отделении Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН. Из них 25 больных с бронхиальной астмой средней степени тяжести заболевания, 25 больных – с тяжелой формой и 40 больных – после лечения аколатором (зафирлукаст фирмы «Zeneca» по 60 мг ежедневно в течение 30 дней). Диагноз БА верифицирован согласно критериям: наличие характерного анамнеза, типичных клинических симптомов астмы, атопии (аллергический анамнез, аллергопробы).

Больным проводилось эндоскопическое обследование бронхиальных путей с последующим забором биопсийного материала: при поступлении – до лечения аколатором и после 60-дневного курса лечения. Материал заливался в парафин, готовили срезы, на которых проводились следующие гистохимические реакции:

1. Определение гистамина по Шампи-Кужару.
2. Определение перекисей жирных кислот по Винклеру-Шульце.
3. Метахромазия в тканевых элементах слизистой оболочки с помощью метилового синего и азура I при различных значениях pH.

Биохимические исследования: определение содержания серотонина и гистамина в периферической крови проводилось по методу Л.Я.Прошиной. Флюоресценцию образовавшихся флюорофоров измеряли на флюориметре «Hitachi» (Япония).

Результаты исследования и их обсуждение

При бронхиальной астме мы сталкиваемся с тяжелыми метаболическими нарушениями в слизистой оболочке бронхов у пациентов в случаях длительного течения этого заболевания. Гистохимическими и биохимическими методами в первые дни приступа отмечаются увеличение в соединительной ткани слизистой интенсивной реакции на катионные белки,

Таблица

Активность перекисного окисления и биогенноактивных веществ при бронхиальной астме

Показатели	МДА, мкмоль/л	Токоферол, мкг/мл	Гистамин, мкг/мл	Серотонин, мкг/мл
Контроль	0,6±0,04	1,5±0,03	0,02±0,02	0,03±0,08
Бронхиальная астма до лечения	1,08±0,08 p<0,001	1,4±0,1 p<0,05	0,117±0,006 p<0,001	0,03±0,005 p<0,05
после лечения	0,9±0,06 p<0,05	1,53±0,02	0,05±0,008 p<0,05	0,05±0,002 p<0,05

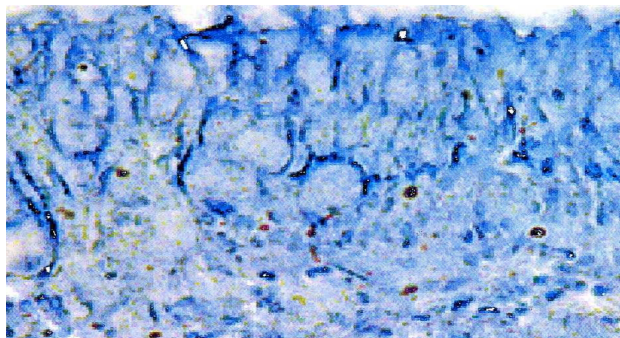


Рис. 1. Бронхиальная астма. Метиленовая синька, pH=1,0. В клеточной мембране интраэпителиальных лимфоцитов выявляется α -метахромазия. Увеличение 15? 40.

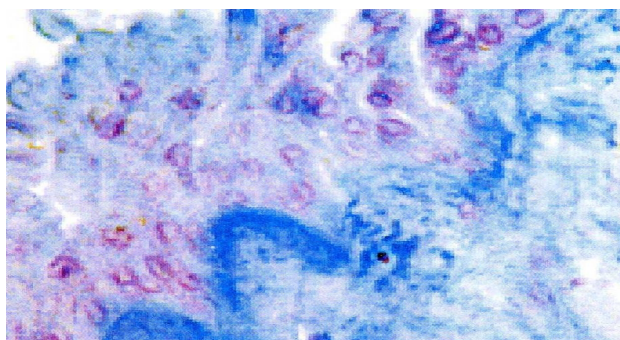


Рис. 2. Бронхиальная астма средней тяжести. Метиленовая синька, pH=3,6. Соединительная ткань и эпителий содержит большое количество лимфоцитов с резко выраженной γ -метахромазией. Увеличение 15? 20.

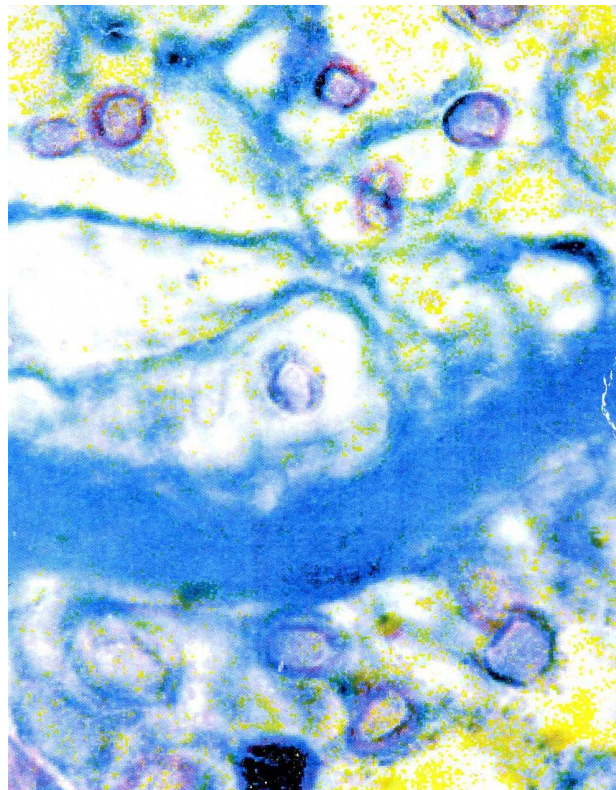


Рис. 3. Бронхиальная астма средней степени тяжести. Эпителий содержит много интраэпителиальных лимфоцитов. Пациент прошел 30-дневный курс лечения аколатором. Мембраны у 90% лимфоцитов выявляют только α -метахромазию. Окраска метиленовой синькой, pH=3,6. Увеличение 15? 40.

накопление, как в эпителиальных клетках, так и в периферической крови (табл.) гистамина, серотонина, а также увеличение продуктов перекисного окисления липидов. Эти реакции указывают на формирование в период обострения заболевания многих факторов, способных привести к нарушению тканевого метаболизма.

Проводя реакцию у больных с бронхиальной астмой при обострении болезни на выявление метахромазии с азуром I и метиленовой синькой при различных значениях pH, мы отметили, что при pH 0,5-1,0 в эпителиальном пласте слизистой оболочки сосредоточено большое количество интраэпителиальных лимфоцитов, которые маркируются интенсивной α -метахроматической реакцией цитоплазмы – как мети-

леновой синькой, так и азуром I (рис. 1). Базальная мембрана слизистой остается неокрашенной, как и цитоплазма эпителиальных клеток.

Реакция с метиленовой синькой и азуром I при pH=3,6-4,0 показывает активную реакцию слизистой на хондроитинсульфаты в бокаловидных клетках и волокнистых структурах соединительной ткани. На фоне тяжелого течения бронхиальной астмы до 25% волокнистых структур слизистой бронхов до лечения проявляют γ -метахромазию. В толще эпителиального слоя отмечается большое количество интраэпителиальных лимфоцитов, у которых клеточная мембрана интенсивно проявляет γ -метахромазию, свидетельствуя о высокой активности сиаловых кислот (рис. 2-3). После про-

веденного в течение 30 дней курса лечения аколатором γ -метахромазия мембран лимфоцитов на 90% при окраске метиленовой синькой при pH=3,6-4,0 исчезает, сменяясь α -метахромазией. Это свидетельствует, что зарядность сиаловых кислот в клеточных мембранах снижается. В соединительной ткани γ -метахромазию выявляется не более чем 10% волокнистых структур.

Однако абсолютную закономерность у всех пациентов отметить трудно. Скорее всего, это четко выраженная тенденция, выступающая в структурах слизистой оболочки при тяжелой форме бронхиальной астмы. Объясняется она действием многочисленных повреждающих факторов с различной степенью токсичности, образующихся в слизистой оболочке при длительно протекающем патологическом процессе; с различной интенсивностью они меняют в одних и тех же тканевых структурах полимерность строительного материала как клеток, так межклеточного вещества.

Достоверно, что после курса лечения аколатором, нейтрализующим накапливающиеся в слизистой оболочке бронхов лейкотриены, резко выраженной метахромазии в слизистой тех же пациентов не обнаруживается. Практически исчезает γ -метахромазия в пучках коллагеновых волокон, снижается интенсивность γ -окраски в базальной мембране, которая становится слабо-фиолетовой. Исчезает γ -метахромазия в мембранах лимфоцитов, интенсивно инфильтрирующих эпителий слизистой оболочки.

Таким образом, используя метод метахроматического окрашивания, можно прогнозировать тяжесть течения метаболических процессов при обострении бронхиальной астмы и, до некоторой степени, оценить эффективность проводимого лечения по выраженности конформационных изменений полимерных структур в клеточных мембранах и межклеточном веществе.

Особое внимание следует обратить на метахромазию в клеточных мембранах лимфоцитов, поскольку при pH=2,5-4,0 метахромазия характерна для обнаружения сиаловых кислот. Интенсивная реакция γ -метахроматического окрашивания ($90\% \pm 3,2\%$) мембран лимфоцитов при обострении бронхиальной астмы свидетельствует об активизации процесса, приводящего к реакции $AG \leftrightarrow AT$ (антиген-антитело), способствующей выработке в очаге повреждения слизистой бронхов большого количества иммунокомплексов. Вероятно, это становится причиной проникновения этих комплексов как самостоятельно, так и вместе с лимфоцитом сквозь базальную мембрану слизистой оболочки бронхов.

Используя метод метахроматического окрашивания, мы отчетливо регистрируем процесс инфильтрации эпителия слизистой, особенно на этапе начальных стадий обострения бронхиальной астмы, лимфоцитами с

интенсивной реакцией γ -метахромазии. Эти лимфоциты приводят к дезинтеграции связей между эпителиальными клетками и нарушению их дифференцировки. Неудивительно, что при затянувшихся процессах обострения бронхиальной астмы в толще эпителия накапливаются, наряду с биогенноактивными веществами (серотонин, гистамин), еще и иммунные комплексы большой молекулярной массы и с большим отрицательным зарядом, формируемым сиаловыми кислотами, обнаруживающимися на поверхности интраэпителиальных лимфоцитов. Складываются условия для разрушения эпителия слизистой, что наблюдается, в подавляющем большинстве случаев, при анализе биопсийного материала, взятого в этот момент у больных с бронхиальной астмой. При средней и тяжелой степени бронхиальной астмы в 75-80% случаев нормального плана строения эпителия слизистой бронхов обнаружить не удастся - эпителий перестраивается в дву- или однорядный, состоящий из клеток низкопризматической или кубической формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов В.В., Фукс Б.Б. Дифференциальное гистохимическое выявление мукополисахаридов // Арх. патол. 1961. №2. С.74-78.
2. Сравнительная оценка методов гистохимического выявления мукополисахаридов в тканях провизорных органов человека и млекопитающих / Виноградов В.В. [и др.] // Арх. анат., гистол., эмбриол. Т.XLII, №2. 1962. С.103-109.
3. Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия. Будапешт: Изд-во Акад. наук Венгрии, 1962. 399 с.
4. Кононский А.И. Гистохимия. Киев: Изд-во Объединения "Вища школа", 1976. 277 с.
5. Кутах Г.И., Шубич М.Г. Метод сохранения метахромазии в постоянных препаратах // Арх. анат., гистол., эмбриол. 1965. Т.XLIX, №8. С.108-109.
6. Луценко М.Т. Углеводный обмен и выявления продуктов тканевого метаболизма гистохимическими методами. Благовещенск: Амурский гос. ун-т; Сиб. отд-ние РАМН, 2006. 163 с.
7. Пирс Э. Гистохимия. М.: Изд-во Иностран. Литерат., 1962. С.224-236.
8. Шубич М.Г., Лопунова Ж.К., Могильная Г.М. Экономный метод дифференциального гистохимического анализа полисахаридов // Арх. анат., гистол., эмбриол. 1966. Т.L, №1. С.71-74.
9. Шубич М.Г., Могильная Г.М. Распределение катионных биополимеров в эпидермисе кожи человека // Арх. анат., гистол., эмбриол. 1973. Т.LXV, №8. С.8-12.
10. Michaelis L., Granick S. Metachromasy of basic dyestuffs // J. Am. Chem. Soc. 1945. Vol.67. P.1212-1219.
11. Sylven B. Metachromatic dye substance interaction // Qurt. J. Microscop. Sci. 1954. Vol.95. P.3.

Поступила 11.02.2009

Михаил Михайлович Луценко, младший научный сотрудник,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22;
Mikhail M. Lutsenko.,
22 Kalinin Str., Blagoveshensk, 675000;
E-mail: cfpd@amur.ru