

УДК 616.248: 616.233-002: 611.018.73

Т.И.Бобровник

НЕКОТОРЫЕ ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ ОБЪЯСНИТЬ МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ ОБСТРУКЦИИ МЕЛКИХ БРОНХОВ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ*ГУ Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН***РЕЗЮМЕ**

При бронхиальной астме (БА) в силу высокой аллергической реакции и активизации иммунно-генетических зон ДНК происходит нарастание биогенноактивных веществ, усиливается процесс перекисного окисления и изменяется реакция мессенджеров второго типа таких как NOS-реакция. В данной работе освещается вопрос о характере участия слизистой бронхов у больных БА на различных стадиях течения. Установлена закономерность, что при тяжелой стадии БА, когда выражена необратимая обструкция дистальных бронхов, нарастает количество мышечных элементов в слизистой оболочке, в которых высоко активны реакции на гистамин, перекиси жирных кислот и NOS. Они поддерживают на высоком уровне обструкцию терминальных бронхов.

SUMMARY

T.I. Bobrovnik

HISTOCHEMICAL REACTIONS EXPLAINING MECHANISMS OF BRONCHUS OBSTRUCTION IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Bronchial asthma (BA) due to high allergic reaction and activated immune-genetic DNA zones causes an increase in bio-genetic substances, peroxidation process, and changes in messenger reaction of second type such as NOS-reaction. This paper describes bronchus mucosa involvement in patients with BA at different disease stages. The study indicated that severe BA with irreversible distal bronchus obstruction increases muscular elements in bronchus mucosa which show high reactions to histamine, fat acid peroxide and NOS. They are responsible for the high level of terminal bronchus obstruction.

Функциональное состояние дистальных отделов бронхиальных путей во многом зависят от клеточно-го метаболизма гладкой мускулатуры слизистой оболочки бронхов. Получая постоянно сигналы со стороны эндокринных органов, пептидных гормонов и нейромедиаторов, в гладких мышечных клетках происходят функциональные изменения. Вторичные мессенджеры определяют этот функциональный настрой гладкой мускулатуры. К этим мессенджерам можно отнести кальций, цАМФ, цГМФ, инозитолтрифосфат, диацилглицерол, арахидоновую кислоту и окись азота (NO). В последнее время большое внимание уделяется окиси азота, которая может существенно влиять на цГМФ.

цГМФ обладает лабильными SH-группами, окисление которых приводит к увеличению активности

фермента [1]. В качестве окислителей SH-групп гуанилатциклазы могут выступать O_2 , NO, перекиси жирных кислот. Для проявления максимальной активности гуанилатциклазы в присутствии NO необходимы не окислители, а восстановители SH-групп [2]. Таким образом, окислители SH-групп повышают активность гуанилатциклазы в отсутствие NO. Установлено, что повышение уровня кальция приводит к активности NO-синтазы – фермента, участвующего в окислении гуанидинового азота L-аргинина до окиси азота и эта реакция опосредована через взаимодействие кальция с кальмодулином [3]. Под влиянием NO осуществляется активация растворимой гуанилатциклазы и увеличение уровня цГМФ.

Существует семейство NO-синтаз (NOS), которые выявляются в различных тканях. Кальций-зависимая NO-синтаза постоянно присутствует в клетке и способствует выделению небольшого количества NO на короткий период в ответ на рецепторную и физическую стимуляцию.

Ацетилхолин, кальций-ионофор активируют конститутивную NO-синтазу, быстро увеличивают концентрацию внутриклеточного кальция, приводя к высвобождению NO за считанные секунды или минуты. Кальций-независимая индуцированная (индуцибельная) NO-синтаза образуется в различных типах клеток в ответ на провоспалительные цитокины, эндотоксины и оксиданты. Она описана в макрофагах, нейтрофилах, гладких мышечных клетках, эндотелиоцитах.

Индукция специфических генов приводит к синтезу этой изоформы NO-синтазы. Индукция этой формы NO вызывает вазодилатацию, а при длительном процессе большие концентрации оксида азота проявляют уже не регуляторное, а цитотоксическое действие, приводящее к различным патологическим изменениям морфологического и аутоиммунного характера.

Эндотелиальная кальций-зависимая NO-синтаза непрерывно генерирует оксид азота из L-аргинина, поддерживая нормальный тонус сосудов. Синтез оксида азота всеми изоформами фермента является регулируемым процессом и может тормозиться различными аналогами L-аргинина, которые являются конкурентными ингибиторами NO-синтазы. Увеличение синтеза оксида азота является важной составной частью компенсаторно-приспособительных реакций в ответ на перенесенную аллергическую реакцию. Переизбыток свободно-радикальных продуктов NO оказывает вред, так как они обладают способностью повреждать белки и ненасыщенные жирные кислоты, уменьшать активность большинства ферментных систем (исключение составляет гуанилатциклаза).

В избытке NO нарушает целостность клеточных и

субклеточных структур, разобщает окислительное фосфорилирование в митохондриях, ингибирует транспорт электронов по дыхательной цепи и снижает уровень АТФ в клетках. С иммунологической точки зрения избыток NO приводит к подавлению активности Т-хелперов, снижает синтез γ -интерферона. Наиболее неприятным моментом можно считать то, что NO способен вызвать мутагенные нарушения, обладая тератогенной активностью.

Цитостатическое действие NO обусловлено его способностью продуцировать в реакции с супероксидным радикалом пероксинитрит (ONOO^-). Этот анион при физиологических значениях pH, присоединяя протон, в течение секунды распадается, оказывая тем не менее сильнейшее окислительное действие на различные внутриклеточные мишени. Он и определяет цитотоксическое действие пероксинитрита, вызывающего гибель клеток и тканей по механизмам апоптоза и некроза. Генерация апоптоза клеток наступает, как правило, при высоких концентрациях NO в клетках и тканях. NO способен инициировать усиленный синтез проапоптотического белка p53. В то же время NO может подавлять апоптоз. Такая разнонаправленность действия NO на апоптоз требует дальнейшего изучения.

Материал и методы исследования

Было обследовано 60 пациентов с бронхиальной астмой. У всех пациентов проводилась бронхоскопия с последующим забором биопсийного материала. Выполнялись на криостате срезы биоптата, на которых проводились следующие гистохимические реак-

ции: активность аденилатциклазы по Reik (1970) [4]; активность НАДФН-диафоразы (информация о состоянии внутриклеточного окисления и активности NO-синтазы) по методу Д.Коржевского [5]; гистамин определялся по методу Champy С. и Conjard R. [6]; активность АТФазы определяли по методу Падикула-Хермана [7].

Результаты исследования

В процессе развития заболевания в организме лиц, страдающих бронхиальной астмой, происходит нарастание в периферической крови гистамина и серотонина. В контроле количество гистамина не превышало 0,02 мкг/мл, в то время как уже при средней тяжести течения бронхиальной астмы содержание гистамина в периферической крови нарастало до $0,09 \pm 0,002$ мкг/мл, а при тяжелой форме течения – до $0,125 \pm 0,005$ мкг/мл. Это не могло оставить безучастными ткани слизистой, и в мышечных элементах при средней и тяжелой формах течения заболевания обнаруживается интенсивная реакция на гистамин (рис. 1).

Помимо гистамина в периферической крови при тяжелой форме заболевания нарастает содержание количество серотонина (табл.).

Наличие в тканях повышенного содержания гистамина и серотонина стимулирует процесс перекисного окисления жирных кислот. В эпителиальных клетках и мышечных элементах слизистой гистохимическими методами выявляется интенсивная реакция на перекиси жирных кислот (рис. 2).

На стадии тяжелого течения заболевания в слизи-

Таблица

Активность перекисей жирных кислот, гистамина и серотонина на различных стадиях БА

Показатели	МДА, мкМоль/л	Токоферол, мкг/мл	Гистамин, мкг/мл	Серотонин, мкг/мл
Легкая форма БА	$1,02 \pm 0,04$	$1,3 \pm 0,5$	$0,05 \pm 0,001$	$0,04 \pm 0,002$
Средней тяжести	$1,08 \pm 0,08$	$0,95 \pm 0,09$	$0,09 \pm 0,002$	$0,06 \pm 0,0015$
Тяжелая форма течения заболевания	$1,75 \pm 0,06$	$0,85 \pm 0,04$	$0,125 \pm 0,005$	$0,07 \pm 0,002$
Контроль	$0,5 \pm 0,02$	$1,8 \pm 0,3$	$0,02 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,0015$

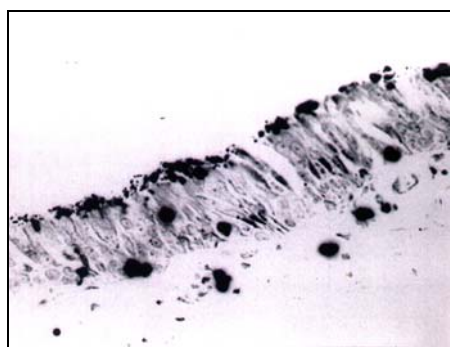


Рис. 1. Слизистая оболочка бронха у больного с БА на стадии тяжелого течения. В эпителии слизистой оболочки бронхов накапливается большое количество гистамина. Реакция на гистамин по Champy и Conjard. Увеличение 15×20 .



Рис. 2. Слизистая оболочка бронха у больного с БА на стадии тяжелого течения. В эпителии интенсивная реакция на перекиси жирных кислот. Реакция по Шульце-Винклеру. Увеличение 15×100 .

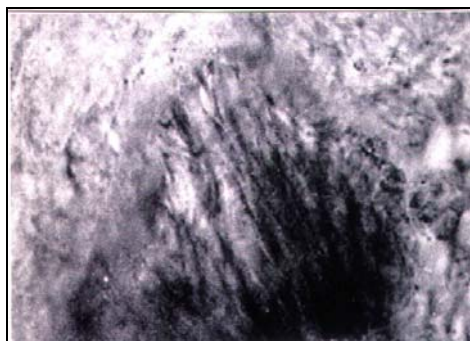


Рис. 3. Слизистая оболочка бронха у больного с БА на стадии тяжелого течения. В мышечных элементах интенсивная реакция на NOS свидетельствует об избытке синтеза NO. Реакция на NOS по Коржевскому.

Увеличение 10×40 .

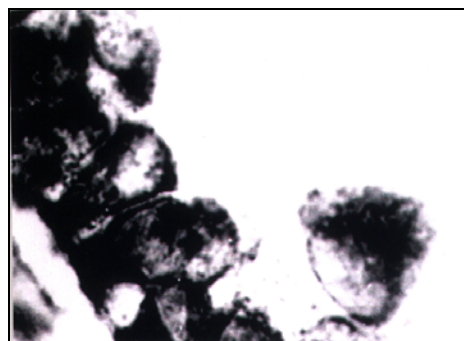


Рис. 4. Слизистая оболочка бронха у больного с БА на стадии тяжелого течения. В слизистой оболочке высокая активность реакции на аргининдегидрогеназу.

Увеличение 15×40 .

стой оболочке терминальных отделов бронхиального дерева мы обнаруживали в гладких мышечных клетках и в эпителии высокую интенсивность реакции на NOS (рис. 3). Одновременно в этих клетках происходило интенсивное накопление продуктов NO, поскольку гистохимическая реакция на аргининдегидрогеназу была очень высокой (рис. 4).

Выводы

Итак, по мере формирования обструктивного синдрома в организме больных БА происходят глубокие нейро-гуморальные и ферментативные изменения в периферической крови и тканях слизистой оболочки:

- увеличивается синтез гистамина и серотонина;
- появляются признаки интенсивной гистохимической реакции на перекиси жирных кислот в эпителии и мышечных элементах слизистой оболочки;
- реакция на NOS становится чрезвычайно высокой в гладких мышечных элементах.

Все вышеизложенное объясняет нарастание необратимых обструктивных реакций в результате глубоких морфо-функциональных нарушений в гладкой мускулатуре слизистой оболочки бронхов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуанилатциклаза – функции в норме и при патологии [Текст]/И.С.Северина//Вестник АМН СССР.-1987.-№7.-С.41.
2. Определение активности НАДФН-диафоразы в головном мозге крыс после фиксации разной длительности [Текст]/В.Э.Коржевский//Морфология.-1996.-Т.109, №7.-С.76-77.
3. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system. A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase [Text]/Knowles R.G. [et al.]/Proc. Nat. Acad. Sci. USA.-1989.-Vol.86, №13.-P.5159.
4. Hormone sensitive adenylyl cyclase: cytochemical localization in rat liver [Text]/J.Reik, G.Petzold, J.Higgins//Science.-1970.-Vol.168.-P.382-384.
5. Reversible inactivation of guanylate cyclase by mixed disulfide formation [Text]/H.J.Brandwein, J.A.Lewicki, F.Murag//J. Biol. Chem.-1981.-Vol.256, №6.-P.2958.
6. Sur une reaction histoquinique de l'histamine utilisabl pour l'etude des nerfs [Text]/Champy C. [et al.]/Bull. Microsc. Appl.-1956.-Vol.6, №4.-P.89-93.
7. Histochemical method reaches ATP-ase [Text]/H.Padykula, Herman//J. Histochem. Cytochem.-1955.-Vol.161.-P.171.

