

В.А.Невзорова, М.Ю.Протопопова, Е.В.Елисева, В.Ф.Баранов, Б.И.Гельцер
НАДФН-ДИАФОРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭПИТЕЛИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Кафедра гистологии, кафедра пропедевтики внутренних болезней Владивостокского
медицинского университета

NADPHN-DIAPHORASE ACTIVITY OF THE RESPIRATORY EPITHELIUM DURING BRONCHIAL ASTHMA

V.A.Nevzorova, M.Yu.Protopopova, E.V.Eliseeva, V.F.Baranov, B.I.Geltser

S u m m a r y

The activity and topochemistry of the NADPHN-diaphorase co-localized with NO-syntase were studied for the surgical material taken after lung resection of patients suffering from bronchoal asthma. An unevenness of the morphological indicators has been determined for the respiratory tracts' membranous wall remodelling. This unevenness has specified different intensity of the epithelium' NADPHN-diaphorase reaction. Enzyme moderate activity in small and medium bronchi prevailed for mild persisting bronchial asthma. The both number of small and medium bronchi with the increased NO-syntase and its level grew with the disease severity. In parallel the number of the bronchi with the reduced enzyme expression increased. This is probably due to the development of irreversible obstruction signes. The high level of the enzyme was also revealed in the cells being the inflammation residents (alveolar macrophages and tissue basophile) and the cells type in the alvelotsitakh during a severe bronchial asthma

Р е з ю м е

Исследована топохимия и активность НАДФН-диафоразы, солокализованной с NO-синтазой в операционном материале легких больных бронхиальной астмой (БА). Установлена неравномерность морфологических признаков ремоделирования стенки дыхательных путей, определившая различную интенсивность НАДФН-диафоразной реакции эпителия. При легкой персистирующей БА преобладала умеренная активность энзима в мелких и средних бронхах. С нарастанием тяжести процесса увеличивалось как число мелких и средних бронхов с повышением NO-синтазы, так и ее уровень. Параллельно происходило увеличение количества бронхов со сниженной экспрессией фермента, видимо, связанное с присоединением необратимых признаков обструкции. Высокий уровень энзима также обнаружен в клетках — резидентах воспаления — альвеолярных макрофагах и тканевых базофилах, а при тяжелой БА и в альвелоцитах 1.

В основе формирования бронхообструктивного синдрома (БОС) при бронхиальной астме (БА) лежат воспалительные изменения в дыхательных путях, ведущие к нарушению целостности эпителиального пласта [2,3]. Интактный эпителий способен разрушать естественные бронхоконстрикторы и продуцировать вещества, расслабляющие гладкую мускулатуру бронхов. В последние годы доказана его способность вырабатывать окись азота (NO) — эндогенный релаксирующий фактор [4,5,12]. Однако влияние NO на тонус гладких миоцитов и механизмы формирования обструкции и гиперреактивности бронхов при БА изучены недостаточно [15,17,19,].

Цель нашей работы состояла в цитохимической идентификации и количественной оценке НАДФН-диафоразы (фермента, сопряженного с NO-синтазой — NOS) в легких больных БА с различной степенью тяжести заболевания.

Фермент исследовали в операционном материале легких после резекции по поводу злокачественных, доброкачественных новообразований, аномалий развития или кист больных БА. Для изучения активности энзима выбирали небольшие участки органа, не пораженные бластоматозным или кистозным процессом, в которых постоянно встречались мелкие bronchi и выборочно bronchi среднего диаметра. Контрольную группу составили больные без клинических, лабораторных, функциональных и морфологических признаков воспаления и обструкции бронхов ($n=2$, возраст $46,5 \pm 6,4$ года). При постановке диагноза БА, определении ее формы и степени тяжести руководствовались рекомендациями GINA [1]. У всех больных наблюдалась персистирующая форма заболевания: тяжелая астма установлена у двух больных (возраст $47,5 \pm 9,4$ года), астма средней тяжести у 3 (возраст $35,7 \pm 9,2$), легкая астма у 5 (возраст $27,6 \pm 8,6$ года).

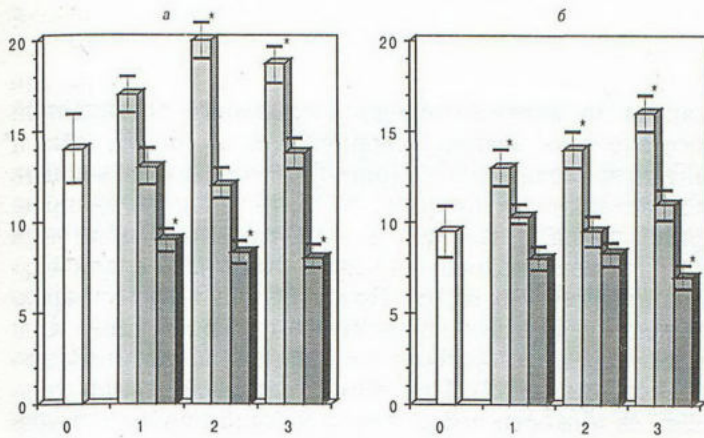


Рис.1. Состояние НАДФН-диафоразной активности эпителия бронхов при бронхиальной астме различной степени тяжести.

а — бронхи среднего диаметра; б — мелкие бронхи; 1 — БА легкого течения; 2 — БА среднетяжелого течения; 3 — БА тяжелого течения; Светлый столбик — контроль; 1-й столбик в каждой группе — повышенная активность НАДФН-диафоразы; 2-й столбик — умеренная активность энзима; 3-й столбик — сниженная активность.
* — различия достоверны по отношению к контролю при $p < 0,05$.

НАДФН-диафорузу выявляли по прописи, приведенной в работе *Hope, Vincent* [11]. Участки легких размером $1 \times 0,5$ см выделяли с помощью лезвия и опускали в охлажденный, приготовленный на $0,1$ М фосфатном буфере (pH 7,4) 4% параформальдегид, который из всего класса диафораз сохраняет активность только НАДФН-диафоразы. Материал продолжали фиксировать 2 ч при $4^\circ C$, затем сутки промывали при той же температуре в 15% растворе сахарозы. Из образцов, замороженных в криостате, изготавливали срезы толщиной 10 мкм, монтировали на предметные стекла и помещали в инкубационную среду, состав и конечная концентрация которой были следующими: 50 мМ трис-НСI-буфер (pH 8,0), 1 мМ НАДФН ("Sigma"), $0,5$ мМ нитросинего тетразолия — НСТ ("Sigma") и $0,2\%$ тритон X-100 ("Sigma"). Инкубацию проводили в течение 60 мин при $37^\circ C$, после чего срезы ополаскивали в дистилляте, обезвоживали и заключали в бальзам по общепринятой методике. Под влиянием НАДФН-диафоразы НСТ трансформируется в диформазан голубого или синего цвета. Интенсивность окраски и плотность преципитата свидетельствуют не только об уровне активности диафоразы, но и солокализованной с ней конститутивной (сNOS) и индуцибельной (iNOS) NOS [6,7,8]. Количественную оценку активности НАДФН-диафоразы проводили на цитоденситометре *Vickers M-85* (Англия).

В контрольной группе обследованных на НАДФН-диафорузу реагировал эпителий средних бронхов, имеющих в стенке фрагменты волокнистого хряща и эпителий мелких бронхов 11 — 16 порядка по *Weibel* [21]. При этом активность фермента в бронхах с хрящевой основой была выше (рис.1, а,б), что, видимо, связано, по данным литературы, с более выраженной экспрессией сNOS в крупных бронхах, носовых ходах и трахее, активно вырабатывающих окись азота в физиологических условиях, обеспечивая тем самым адекватную бронходилатацию [6,9].

При БА наблюдались значительные морфологические изменения как в мелких, так и в бронхах среднего диаметра. Их выраженность, распространенность и характер зависели от тяжести процесса. При легкой персистирующей астме преимущественно поражены мелкие бронхи: эпителий очагово десквамирован, бокаловидные клетки гиперплазированы, с признаками гиперсекреции, в просвете бронхов видна слизь, смешанная с эпителиоцитами и макрофагами, перибронхиально в большом количестве (до 17 в поле зрения) находятся дегранулирующие тканевые базофилы, в подслизистом слое участками встречаются инфильтраты из лимфоидных клеток и гистиоцитов. При персистирующей астме средней тяжести изменения наблюдаются не только в слизистой оболочке стенки дыхательных путей, но и в подслизистом слое, который отечен и интенсивно инфильтрирован мононуклеарами с очагами фиброза. Количество перибронхиально расположенных тканевых базофилов ниже по сравнению с легкой персистирующей астмой и составляет $8,9 \pm 1,5$ клетки в поле зрения. При тяжелом течении заболевания структурные изменения дыхательных путей распространяются и на бронхи среднего диаметра, в их стенке более выражены морфологические признаки стойкой обструкции — разрастание соединительной ткани, гипертрофия и гиперплазия мышечных волокон.

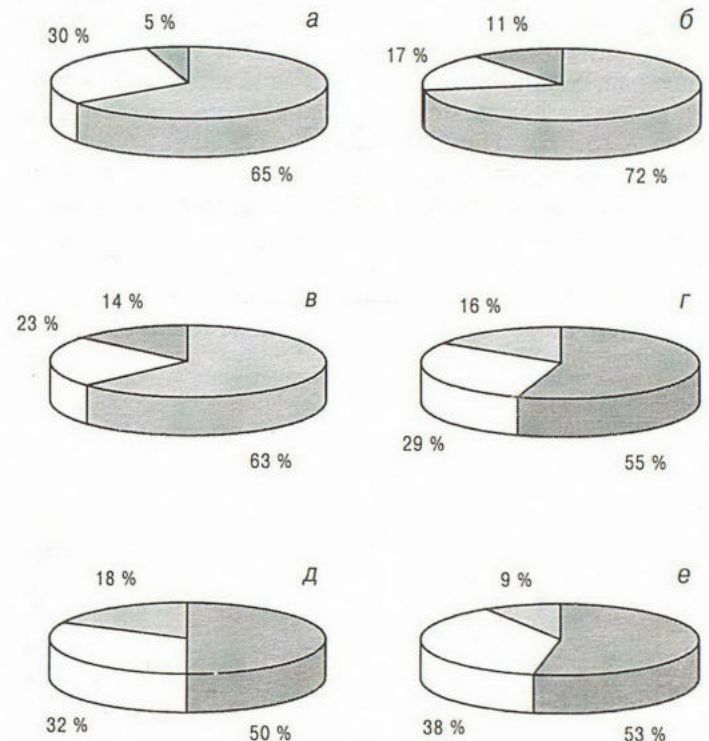


Рис.2. Соотношение бронхов с различной активностью НАДФН-диафоразы при бронхиальной астме легкого, среднетяжелого и тяжелого течения.

а, б — БА легкого течения; в, г — БА среднетяжелого течения; д, е — БА тяжелого течения; а, в, д — бронхи среднего диаметра; б, г, е — мелкие бронхи; Светлый сектор — сниженная активность НАДФН-диафоразы; сектор серого цвета — умеренная активность фермента; сектор темного цвета — повышенная активность НАДФН-диафоразы.

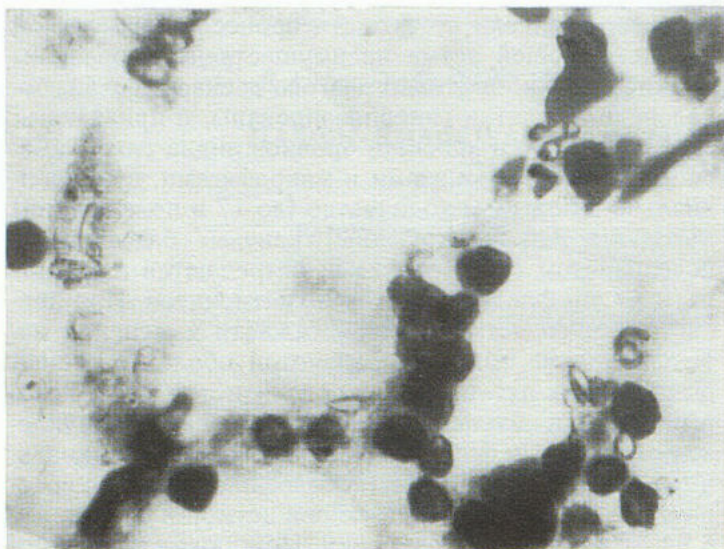


Рис.3. Мелкий бронх с активностью НАДФН-диафоразы в эпителиальном пласте и гладких миоцитах больной, 37 лет, с диагнозом БА среднетяжелого течения. Метод *Hope & Vincent*. Ув.х200.

Во всех группах обследованных наблюдалась неравномерность морфологических признаков ремоделирования стенки дыхательных путей, что, видимо, и определило различную НАДФН-диафоразную активность эпителия (рис.2). Так, при легкой персистирующей астме преобладала умеренная активность НАДФН-диафоразы как в мелких, так и в средних бронхах (рис.2, а, б). Наблюдалось небольшое количества мелких бронхов с повышением активности энзима, тогда как число бронхов среднего диаметра с тенденцией к повышению его активности было в два раза меньше и уровень фермента достоверно не отличался от контрольной группы. Видимо, такое распределение НАДФН-диафоразы в эпителиальном пласте при легкой персистирующей астме связано с преобладанием

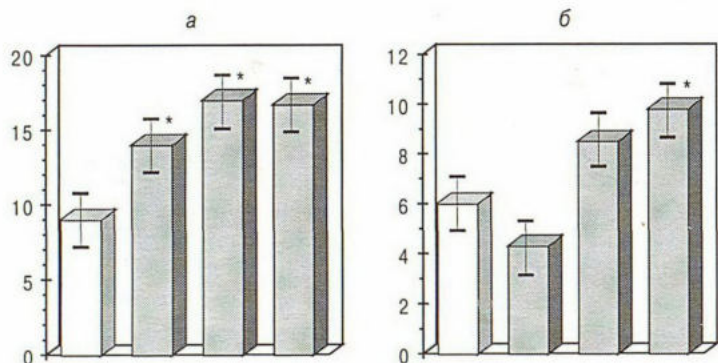


Рис.4. Активность НАДФН-диафоразы при БА различной степени тяжести: а) в альвеолярных макрофагах; б) в альвеолоцитах 1 типа.

Светлый столбик — контроль; 2-й столбик — БА легкого течения; 3-й — БА средней тяжести; 4-й — БА тяжелого течения. * — различия достоверны по отношению к контролю при $p < 0,05$.

обратимых нарушений его целостности и ремиссией заболевания на момент обследования.

С нарастанием тяжести процесса увеличивалось как число мелких и средних бронхов с повышенной активностью энзима (см.рис.2, в, г, д, е), так и интенсивность реакции (рис.3). Это можно объяснить возрастанием активности iNOS, интенсивно экспрессирующейся в мелких, а при тяжелой астме и в средних воздухоносных путях в ответ на воспалительные цитокины [6,10,16]. Представляет интерес параллельное увеличение с тяжестью процесса числа мелких и средних бронхов со сниженной активностью энзима (см. рис.2). При этом степень снижения зависела от тяжести заболевания и была наиболее выражена при тяжелой БА. Видимо, стойкая потеря целостности эпителиального пласта, присоединение необратимых склеротических изменений являются одной из причин снижения выработки NO и усугубления имеющихся явлений обструкции.

Помимо эпителиоцитов на НАДФН-диафору реагировали альвеолярные макрофаги — АМ (рис.4,5). Воспалительные цитокины (туморнекротический фактор- α , интерлейкин-1 β , γ -интерферон) способны активировать экспрессию iNOS в АМ [20] и, через повышенную выработку NO, нарушать работу реснитчатого эпителия и усиливать продукцию внутриклеточных адгезивных молекул (ICAM), что способствует персистенции воспаления и поддерживает его хроническое течение [13].

В отличие от АМ, имеющих интенсивную НАДФН-диафоразную реакцию цитоплазмы, в альвеолоцитах 1 типа (АС1) преципитат располагался в виде узкой каймы по периферии клетки. При легкой и среднетяжелой астме активность фермента не отличалась от контроля, а при тяжелой была достоверно выше (см. рис.4, б). Учитывая, что АС1 способны активно выра-

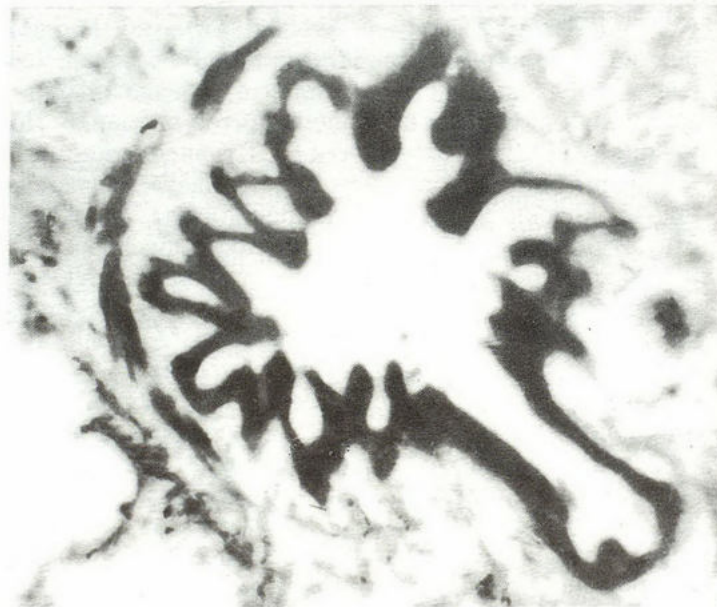


Рис.5. Альвеолярные макрофаги с высокой активностью НАДФН-диафоразы в легких больного 36 лет с диагнозом БА тяжелого течения. Метод *Hope & Vincent*. Ув.х400.

батовать анти-ICAM, тормозящих выработку NO [13], повышение в них экспрессии iNOS при тяжелой астме может быть обусловлено персистенцией воспаления, несмотря на клиническую ремиссию заболевания.

При легкой и среднетяжелой астме, в отличие от контрольной группы, на НАДФН-диафорузу реагировали тучные клетки (ТК). Активность фермента при легкой астме была достоверно выше, чем при астме средней тяжести, и составила $6,6 \pm 1,2$ и $3,5 \pm 0,8$ соответственно ($p < 0,05$). Повышение экспрессии iNOS в ТК при БА связано с особенностями формирования воспалительного процесса, инициаторами которого признаются тканевые базофилы, способные вырабатывать не только биогенные амины, но и NO [18]. В свою очередь, секретируемая ими NO может тормозить избыточную дегрануляцию тучных клеток и стабилизировать воспалительный процесс [14]. Снижение активности фермента в ТК при астме средней тяжести и исчезновение при тяжелой можно объяснить вступлением заболевания в "позднюю" фазу астматического ответа, в реализации которого участвуют другие клеточные элементы — эозинофилы, АМ, лимфоциты.

Таким образом, в контрольных наблюдениях наибольшую NO-синтазную активность проявили эпителиоциты бронхов среднего диаметра. При БА наблюдалась неравномерность морфологических признаков ремоделирования стенки дыхательных путей, определившая различную интенсивность НАДФН-диафоразной реакции эпителия. При легкой персистирующей астме преобладала умеренная активность фермента в мелких и средних бронхах. С нарастанием тяжести воспаления увеличивалось как число мелких и средних бронхов с повышением NOS, так и ее уровень. Параллельно происходило увеличение количества бронхов со сниженной экспрессией фермента, видимо, связанное с присоединением необратимых признаков обструкции. Высокий уровень фермента также обнаружен в клетках — резидентах воспаления — АМ и ТК, а при тяжелой астме и в АС1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бронхиальная астма. Глобальная стратегия. Совместный доклад Национального института Сердце, Легкие, Кровь и Всемирной организации здравоохранения // Пульмонология.— 1996.— Приложение.— С.57—59.
2. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма — глобальная стратегия // Тер. арх.— 1994.— № 3.— С.5—8.
3. Barnes P.J., Holgate S.T., Laitinen L.A., Pauwels R. Asthma mechanisms, determinants of severity and treatment: the role of nedocromil sodium // Clin. Exp. Allergy.— 1995.— Vol.25, № 8.— P.771—778.
4. Adnot S., Raffestin B., Eddahibi S. NO in the lung // Respir. Physiol.— 1995.— Vol.101, № 2.— P.109—120.
5. Asano K., Chee C.B.E., Gaston B. et al. Constitutive and Inducible Nitric-Oxide Synthase Gene-Expression, Regulation and Activity in Human Lung Epithelial-Cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1994.— Vol.91, № 21.— P.10089—10093.
6. Bassoulet C., Lonchamps M., Canet E. Differential Immunolocalization of Type 1, 2, 3 Nitric Oxide Synthase Isoforms in Murine Lung Epithelium // Eur. Respir. J.— 1996.— Vol.9.— P.13s; N0182.
7. Felleybosco E., Ambs S., Lowenstein C.J. et al. Constitutive Expression of Inducible Nitric-Oxide Synthase in Human Bronchial Epithelial—Cells Induces C—Fos and Stimulates the cGMP Pathway // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.— 1994.— Vol.11, № 2.— P.159—164.
8. Gaston B., Drazen J., Loscalzo J., Stamler J. The biology of nitrogen oxides in the airways // Am. J. Respir. Crit. Care Med.— 1994.— Vol.149.— P.538—551.
9. Gerlach H., Rossaint R., Pappert D., Knorr M., Falke K.J. Autoinhalation of Nitric-Oxide After Endogenous Synthesis in Nasopharynx // Lancet.— 1994.— Vol.343, № 8896.— P.518—519.
10. Gutierrez H.U., Pitt B.R., Schwarz M. et al. Pulmonary alveolar epithelial inducible NO-synthase gene expression: Regulation by Inflammatory mediators // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.— 1995.— Vol.12, № 3.— P.L501—L508.
11. Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterisation of neuronal NADPH-diaphorase // J. Histochem. Cytochem.— 1989.— Vol.37.— P.653—661.
12. Johnson B.A., Lowenstein C.J., Schwarz M.A. et al. Culture of Pulmonary Microvascular Smooth-Muscle Cells from Intraacinar Arteries of the Rat — Characterization and Inducible Production of Nitric-Oxide // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.— 1994.— Vol.10, № 6.— P.604—612.
13. Kradin R., Bloch K., Anand A. Nitric Oxide (NO) Secretion by Alveolar Macrophages (MA) is Effectively Inhibited by Anti-Intercellular Adhesion Molecule (ICAM) — 1 // Eur. Respir. J.— 1996.— Vol.9.— P.14s; N0184.
14. Northover A.M., Northover B.J. Rat intestinal mast cell amines are released during nitric oxide synthase inhibition in vitro // Mediat. Inflamm.— 1996.— Vol.5, № 1.— P.32—37.
15. Riccirardolo F.L.M., Spicuzza L., Sapienza M.A. et al. The Inhibition of Nitric Oxide Synthesis does not affect Histamine—Induced Bronchoconstriction in Asthmatics // Eur. Respir. J.— 1996.— Vol.9.— P.35s; N0291.
16. Robbins R.A., Barnes P.J., Springall D.R. et al. Expression of Inducible Nitric Oxide in Human Lung Epithelial — Cells // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1994.— Vol.203, № 1.— P.209—218.
17. Rutgers S.R., Postma D.S., van der Mark Th.W., Koeter G.H. Nitric Oxide in Exhaled Air in COPD // Eur. Respir. J.— 1996.— Vol.9.— P.13s; N0182.
18. Salvemini D., Mazini E., Pistelli A., Mannaioni P.F., Vane J. Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cells reactivity // J. Cardiovasc. Pharmacol.— 1991.— Vol.17, № 3.— P.S258—S264.
19. Taylor D.A., Mc Grath J.L., Jensen M.W., Kharitonov S.A., Barnes P.J. Modulation of Exhaled Nitric Oxide does not affect airway responsiveness in Asthma // Eur. Respir. J.— 1996.— Vol.9.— P.35s; N0290.
20. Thompson A.B., Robbins R.A., Romberger D.J. Immunological function of pulmonary epithelium // Eur. Respir. J.— 1995.— Vol.8.— P.127—149.
21. Weibel E.R. Morphometrics of the lung // Handbook of Physiology Respiration / Ed. W.O. Fenn, H. Rahn.— Washington: Am. Physiol. Society, 1964.— Vol.1.— P.285—307.