

Е.А.Геренг¹, И.В.Суходоло¹, Р.И.Плешко¹, Л.М.Огородова², Е.Б.Букреева³, П.А.Селиванова², А.Н.Дзюман¹,
И.С.Кремис⁴, Т.А.Еремина⁴

Морфологические маркеры ремоделирования слизистой оболочки бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких

1 – кафедра морфологии и общей патологии ГОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет Росздрава": 634050, Томск, Московский тракт, 2;

2 – кафедра факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет Росздрава": 634050, Томск, Московский тракт, 2;

3 – кафедра внутренних болезней педиатрического факультета ГОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет Росздрава": 634050, Томск, ул. Нахимова, 3;

4 – пульмонологическое отделение 3-й городской больницы: 634000, Томск, ул. Нахимова, 3

E.A.Gereng, I.V.Sukhodolo, R.I.Pleshko, L.M.Ogorodova, E.B.Bukreeva, P.A.Selivanova, A.N.Dzyuman, I.S.Kremis, T.A.Eremina

Morphological markers of remodeling of bronchial mucous membrane in severe bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease

Summary

The purpose of the study was to evaluate contribution of tissue and cellular components to the remodeling of bronchial mucous membrane in patients with severe bronchial asthma (BA) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Complex morphological examination of bronchial biopsy specimens was performed. While using novel functional methods, we have found that severe COPD was associated with neutrophil inflammation in the bronchi, metaplasia and hyperplasia of epithelial cells with subsequent development of fibrosis of the lamina propria. In BA, histological abnormalities were related to the increase in a total number of inflammatory cells, thickening of the basement membrane and prominent hypertrophy and hyperplasia of submucosal glands.

Key words: bronchial asthma, COPD, remodeling, bronchial mucous membrane, morphological examination.

Резюме

Целью исследования явилась оценка вклада тканевых и клеточных структур в развитие ремоделирования слизистой оболочки бронхов у больных с тяжелой формой терапевтически-чувствительной бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Впервые проводили морфологическое и морфометрическое исследование бронхобиоптатов слизистой оболочки у этой группы пациентов. При БА гистологические изменения связаны с увеличением общего числа иммунокомпетентных клеток, утолщением базальной мембраны и выраженной бокаловидноклеточной гиперплазией. О гетерогенности ремоделирования слизистой оболочки бронхов позволяют судить индексы бокаловидноклеточной и базальноклеточной гиперплазии. ХОБЛ сопровождается формированием нейтрофильного типа воспаления в бронхиальном дереве с развитием плоскоклеточной метаплазии и базальноклеточной пролиферации эпителиального пласта с последующим развитием фиброза собственной пластинки слизистой оболочки.

Ключевые слова: бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, ремоделирование, слизистая оболочка, морфологическое исследование.

С ростом распространенности патологии органов дыхания особое значение приобретает исследование заболеваний, приводящих к нарушению проходимости воздухоносных путей – бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) [1–3]. В последние годы преобладают тяжелые формы данных нозологий. Формирование БА и ХОБЛ тесно связано с развитием воспаления в стенке бронхов. При этом механизмы тканевого и клеточного ремоделирования слизистой оболочки бронхов, развивающегося при тяжелых формах БА и ХОБЛ, остаются малоизученными [1]. В литературе также отсутствуют данные о детальном морфометрическом исследовании слизистой оболочки бронхов и возможностях использования его результатов в дифференциальной диагностике тяжелых форм БА

и ХОБЛ. В связи с этим актуальным является морфологический анализ слизистой оболочки бронхов при БА и ХОБЛ, в основе развития которых лежат гетерогенные типы клеточных реакций, изменяющие типовую архитектуру бронхиальной стенки.

Целью настоящего исследования стало изучение структурно-функциональной организации слизистой оболочки бронхов и выявление закономерностей формирования воспаления и ремоделирования бронхов у больных БА и ХОБЛ.

Материалы и методы

Проведено одномоментное сравнительное исследование 10 пациентов (9 женщин и 1 мужчины) с тяжелой терапевтически чувствительной формой БА

в возрасте 34–62 лет (средний возраст – $42,3 \pm 10,3$ года) и 15 пациентов с тяжелым течением ХОБЛ (13 мужчин и 2 женщины) в возрасте 54–65 лет (средний возраст – $54,8 \pm 11,6$ года). Обязательным условием участия больного в исследовании было наличие письменного информированного согласия, одобренного локальным комитетом по этике СибГМУ (Томск) № 877 от 10.11.08. Диагностика проведена согласно критериям глобальных стратегий лечения и профилактики БА и ХОБЛ [4, 5]. Общий стаж заболевания при БА составил $14,8 \pm 1,0$ года, у пациентов с ХОБЛ – $18,6 \pm 2,6$ года.

Больные с тяжелой терапевтически чувствительной формой БА соответствовали следующим критериям: положительные результаты кожных аллергопроб (поливалентная сенсibilизация – в 63,5 % случаев); уровень сывороточного иммуноглобулина E (IgE) – $280,0 \pm 32,8$ МЕ/мл; дневные симптомы – $15,6 \pm 1,4$ (в нед.); ночные симптомы – $5,8 \pm 0,7$ (в нед.); количество госпитализаций в год – $2,9 \pm 0,5$; количество вызовов скорой помощи в год – $2,9 \pm 0,5$; объем форсированного выдоха (ОФВ₁) – $71,3 \pm 3,4$ %; обратимость бронхиальной обструкции после ингаляции бронхолитика (Δ ОФВ₁) – $38,1 \pm 3,4$ %; пиковая скорость выдоха – $76,4 \pm 2,8$ %; суточная лабильность бронхов – $30,2 \pm 1,9$ %; прием флутиказона пропионата / сальметерола в дозе не менее 1 000 мкг в сутки по флутиказону; прием салбутамола по требованию; отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних 4 нед. перед исследованием.

Условия включения в исследование пациентов с ХОБЛ были следующими: индекс курения > 20 пачек /лет; длительный анамнез кашля; прогрессирующая одышка; утреннее откашливание мокроты. Данные спирографии у этой группы пациентов соответствовала тяжелой стадии ХОБЛ: постбронходилатационные показатели – ОФВ₁ – $45,7 \pm 3,95$ %; индекс Тиффно (отношение ОФВ₁ к форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ)) – $58,9 \pm 5,53$ %; наличие эмфиземы легких, диагностированной рентгенологически или томографически. В исследование не включались пациенты с другими заболеваниями бронхолегочной системы. Бронхоскопия у всех больных проведена в условиях стационара, через 1 мес. от начала лечения на фоне улучшения клинико-функциональных показателей течения заболевания, вне обострения.

Биоптаты (2–3 фрагмента) забирали во время бронхоскопии из устья среднедолевого бронха правого легкого. Материал фиксировали в 10%-ном забуференном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин по стандартной методике. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону.

При обзорной микроскопии в бронхиобиоптатах оценивали воспалительные, дисрегенераторные и фиброзные изменения в слизистой оболочке.

Морфометрическое исследование выполняли, используя компьютерную программу *ImageJ 3.16*.

С помощью метода точечного счета Автандилова с использованием *Plugins "Grid"* в бронхиобиоптатах подсчитывали объемную плотность покровного эпителия и отдельных клеточных форм ($\text{мм}^3 / \text{мм}^3$), относительный объем соединительной ткани и желез (%). Вычисляли индексы бокаловидноклеточной гиперплазии (отношение объемных плотностей реснитчатых и бокаловидных эпителиоцитов) и базальноклеточной пролиферации (отношение объемной плотности реснитчатых к таковой у базальных клеток) [6]. С помощью *Plugins "Cell"* программы *ImageJ* в 1 мм^2 собственной пластинки слизистой оболочки подсчитывали плотность воспалительного инфильтрата и различных клеточных популяций (лимфоцитов, гистио-макрофагальных элементов, нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов), общее число межэпителиальных эозинофилов, нейтрофилов и лимфоцитов [6]. Применяя окуляр-микрометр, определяли высоту покровного эпителия, толщину базальной мембраны в мкм. Статистическую обработку проводили посредством пакета программ *Statistica for Windows 6.0*. Данные анализировали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты

Морфологические данные

При обзорном гистологическом исследовании биоптатов слизистой оболочки бронхов у пациентов

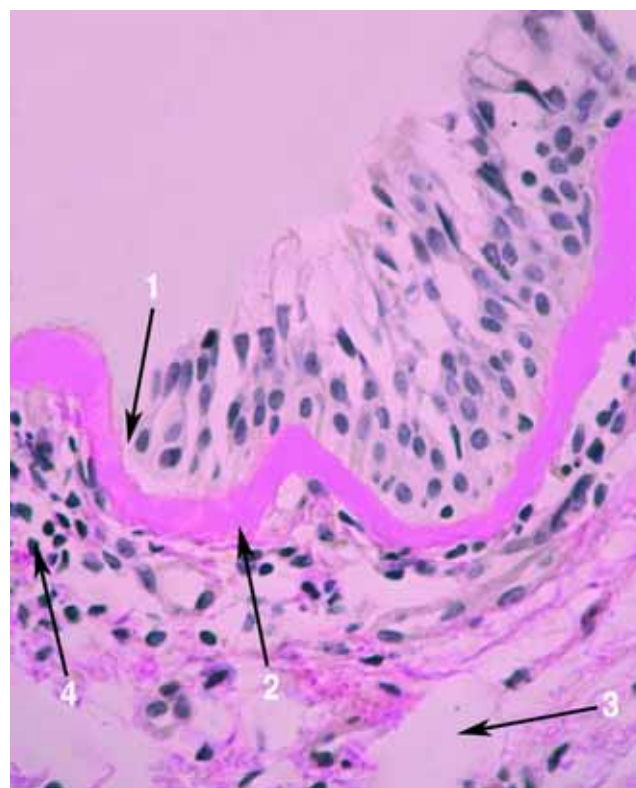


Рис. 1. Слизистая оболочка бронхов пациентки К. с тяжелой формой БА: слущивание бронхиального эпителия и оголение базальной мембраны (1), утолщение базальной мембраны (2), отек (3) и полиморфноклеточный инфильтрат (4) собственной пластинки слизистой оболочки бронхов. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону; $\times 540$

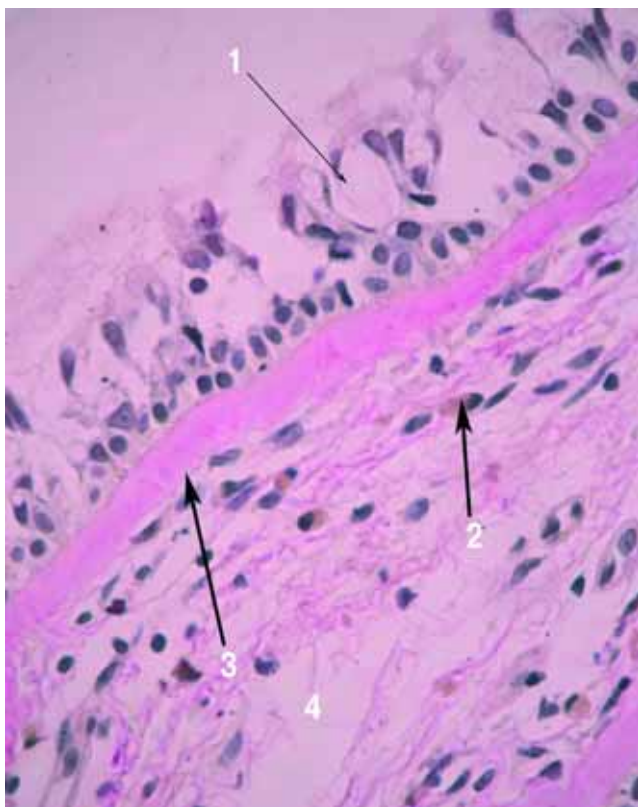


Рис. 2. Слизистая оболочка бронхов пациентки С. с тяжелой формой БА: бокаловидноклеточная гиперплазия (1), единичные эозинофильные гранулоциты (2), выраженное утолщение базальной мембраны (3). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону; $\times 540$

и с БА, и с ХОБЛ выявлены признаки воспаления: полиморфноклеточная инфильтрация, гиперемия сосудов и отек собственной пластинки слизистой оболочки. У больных БА в инфильтрате определялись в основном эозинофильные гранулоциты и лимфоциты. В местах подэпителиальной клеточной инфильтрации бронхиальный эпителий у пациентов с БА был подвержен дистрофическим и деструктивным изменениям (грубодисперсная структура хроматина, зернистость и вакуолизация цитоплазмы, отсутствие ресничек), встречались фокусы усиленно-

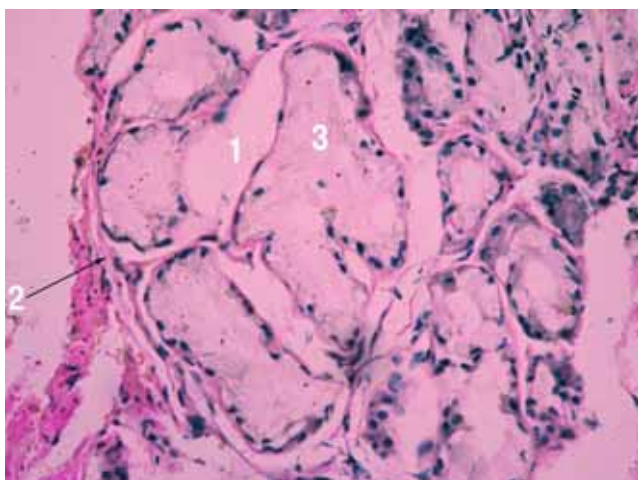


Рис. 3. Биоптат слизистой оболочки бронхов пациентки Ф. с тяжелой формой БА: межжелезистый отек (1), вокругжелезистый фиброз (2), расширение конечного отдела слизистой железы с гиперсекрецией слизи (3). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону; $\times 630$

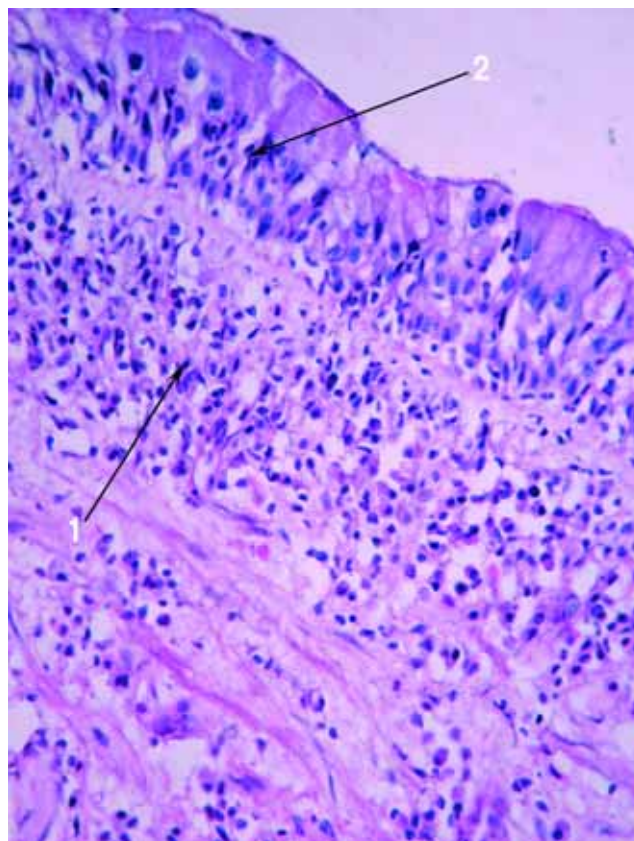


Рис. 4. Биоптат слизистой оболочки бронхов пациента Ф. с ХОБЛ: субэпителиальный полиморфноклеточный инфильтрат (1), интраэпителиальные гранулоциты (2). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 420$

го слущивания эпителиоцитов и оголение базальной мембраны. Во всех случаях обнаруживалось утолщение базальной мембраны покровного эпителия, которая четко контурировалась и была извитой (рис. 1, 2). При тяжелой форме БА в слизистой оболочке бронхов обнаружена бокаловидноклеточная гиперплазия, которая нередко сочеталась с расширением конечных отделов белково-слизистых желез с признаками выраженного застоя и гиперсекреции (рис. 2, 3).

У пациентов с ХОБЛ субэпителиальный воспалительный инфильтрат представлен гистиомакрофагальными клеточными элементами и нейтрофильными гранулоцитами, которые нередко локализовались внутриэпителиально и в пристеночной слизи (рис. 4). Важными отличительными особенностями структурной организации бронхиальной стенки у больных ХОБЛ явились базальноклеточная пролиферация и плоскоклеточная метаплазия поверхностного эпителия (рис. 5).

Морфометрические данные

При морфометрическом анализе биоптатов слизистой оболочки бронхов у пациентов с тяжелой формой БА, по сравнению с ХОБЛ, обнаружена достоверно ($p < 0,01$) меньшая плотность воспалительного инфильтрата (табл. 1). В то же время в клеточном инфильтрате у больных БА повышено количество эозинофилов, лимфоцитов, плазматических клеток с одновременным увеличением общего числа интраэпителиальных форм. В биоптатах слизистой оболочки

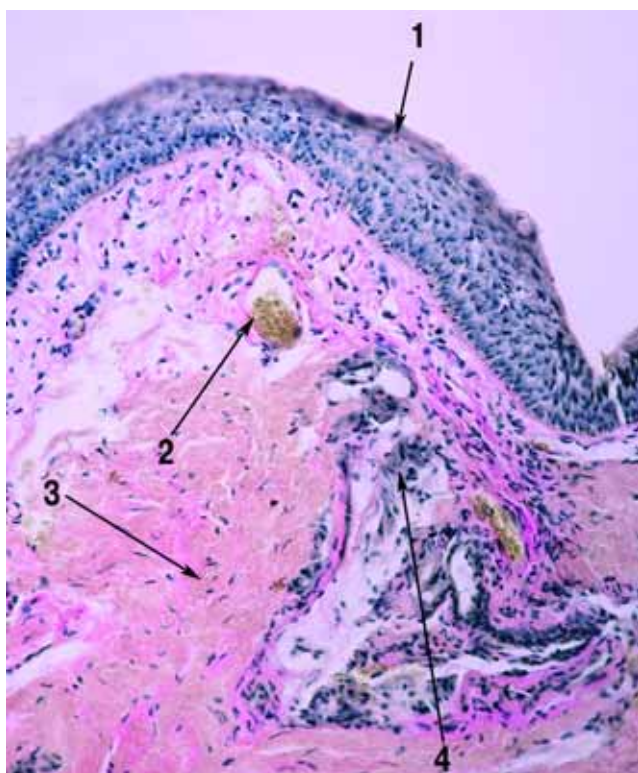


Рис. 5. Биоптат слизистой оболочки бронхов пациента Д. с ХОБЛ: плоскоклеточная метаплазия бронхиального эпителия (1), венозное полнокровие (2), фиброз собственной пластинки слизистой оболочки (3), сдушивание и деструкция железистых клеток (4). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону; $\times 280$

бронхов у пациентов с тяжелой формой ХОБЛ преобладали макрофаги и нейтрофилы (табл. 1).

При тяжелой форме БА в биоптатах слизистой оболочки бронхов выявлены более высокие показатели объемной плотности бокаловидных клеток, сочетающиеся с бокаловидноклеточной гиперплазией. В собственной пластинке слизистой и подслизистой оболочки у больных БА обнаружено достоверное ($p < 0,01$) увеличение относительного объема желез (табл. 2).

При морфометрическом исследовании бронхо-биоптатов у пациентов с ХОБЛ установлено увеличение объемной плотности покровного эпителия и базальных эпителиоцитов (табл. 2), сочетающееся с высоким индексом базальноклеточной пролиферации. Собственная пластинка слизистой и подслизистая оболочка у больных с ХОБЛ характеризовались выраженным фиброзом.

Таблица 1
Клеточный состав инфильтрата слизистой оболочки бронхов у больных с тяжелой формой ХОБЛ и БА, $M \pm t$

Плотность инфильтрата в 1 мм ²	БА (n = 10)	ХОБЛ (n = 15)
Макрофаги	50,91 ± 19,13*	113,71 ± 33,63
Лимфоциты	67,22 ± 3,55*	34,80 ± 15,71
Плазмоциты	15,78 ± 1,34*	6,15 ± 3,12
Нейтрофилы	101,67 ± 7,06*	169,55 ± 44,28
Эозинофилы	5,89 ± 0,86	3,54 ± 2,38

Примечание: n – число пациентов; * – статистическая значимость различий ($p < 0,01$) при сравнении показателей у пациентов с тяжелой формой БА и ХОБЛ.

Обсуждение

В исследовании проанализированы тканевые и клеточные маркеры ремоделирования слизистой оболочки бронхов и их значение в формировании тяжелых форм БА и ХОБЛ. Выявлены специфичные морфометрические показатели и коэффициенты, позволяющие дифференцировать характер структурно-функциональной реорганизации слизистой оболочки бронхов при БА и ХОБЛ. Согласно нашим данным, воспаление при тяжелой БА и ХОБЛ носит различный характер. Это проявляется как в качественных, так и в количественных характеристиках воспалительного инфильтрата. Так, увеличение общего числа эозинофилов, лимфоцитов и плазматических клеток в собственной пластинке слизистой оболочки оказалось доминантным признаком БА. Эозинофилы способны к выработке "фибриногенных" ростовых факторов, участвующих в развитии субэпителиального фиброза при тяжелой форме заболевания. Они стимулируют функциональную активность фибробластов в выработке коллагенов I, III, IV и VIII типов [7–9]. Последние откладываются в базальной мембране, вызывая ее утолщение, что было обнаружено в биоптатах слизистой оболочки бронхов у пациентов с тяжелой формой БА. Важным маркерным признаком БА является бокаловидноклеточная гиперплазия, которая встречалась практически у всех обследованных с этой патологией, в отличие от больных ХОБЛ. Гиперсекреция слизи, обусловленная как увеличением количества бокаловидных клеток, так и возрастающим объемом белково-слизистых желез (рис. 2, 3), способна приводить к формированию приступов удушья [9].

В бронхобиоптатах у пациентов с ХОБЛ, в отличие от больных БА, обнаруживалась выраженная

Таблица 2
Морфометрические показатели слизистой оболочки бронхов при тяжелой форме ХОБЛ и БА, $M \pm t$

Показатели	БА (n = 10)	ХОБЛ (n = 15)
Объемная плотность покровного эпителия, мм ³ / мм ²	0,18 ± 0,04*	0,32 ± 0,09
Объемная плотность реснитчатых эпителиоцитов, мм ³ / мм ²	0,14 ± 0,02	0,19 ± 0,07
Объемная плотность бокаловидных эпителиоцитов, мм ³ / мм ²	0,08 ± 0,04*	0,02 ± 0,01
Объемная плотность базальных эпителиоцитов, мм ³ / мм ²	0,02 ± 0,01*	0,10 ± 0,05
Индекс базальноклеточной гиперплазии	0,14*	0,52
Индекс бокаловидноклеточной гиперплазии	0,10*	0,57
Относительный объем желез, %	38,23 ± 5,04*	21,71 ± 0,83
Относительный объем соединительной ткани, %	61,11 ± 4,97*	77,74 ± 0,81
Высота эпителиального пласта, мкм	71,09 ± 12,65	84,17 ± 26,71
Толщина базальной мембраны, мкм	18,13 ± 4,43*	6,62 ± 2,03

Примечание: n – число пациентов; * – статистическая значимость различий ($p < 0,01$) при сравнении показателей у пациентов с тяжелой формой ХОБЛ и БА.

макрофагальная и нейтрофильная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки. Это может быть связано как с курением, так и с воздействием инфекционных агентов. Табачный дым, участвуя в развитии воспаления, приводит к дисбалансу системы "протеиназы—антипротеиназы", стимулируя оксидативный стресс [3, 10, 11]. Курение табака активизирует выработку макрофагами и эпителиальными клетками фактора некроза опухоли- α , который усиливает выброс интерлейкина-8 и лейкотриена В₄. Эти воспалительные медиаторы активизируют нейтрофилы. Персистирующая инфекция верхних дыхательных путей способна самостоятельно стимулировать дегрануляцию нейтрофильных гранулоцитов. Последние секретируют различные протеиназы, включая нейтрофильную эластазу, нейтрофильный катепсин G и т. д., участвующие в процессе паренхиматозной деструкции при ХОБЛ [8–12].

Нейтрофильный тип воспаления при ХОБЛ, иницируя оксидативный стресс, способен приводить к дисфункции, цитолизу и апоптозу эпителиальных клеток [8, 9]. По данным настоящего исследования, он сопровождается увеличением в бронхобиоптатах объемной плотности эпителиального пласта и развитием плоскоклеточной метаплазии. У пациентов с ХОБЛ метаплазия бронхиального эпителия в многослойный плоский сочеталась с активной базальноклеточной пролиферацией, что выражается повышением соответствующего индекса. Все это может приводить к изменению барьерных и иммунных функции слизистой оболочки и к персистенции воспаления [7, 13]. Нарушение экстрацеллюлярного матрикса собственной пластинки слизистой оболочки при ХОБЛ сопровождается субэпителиальным фиброзом и увеличением объема соединительной ткани. Выявленные нарушения могут стать основой необратимой деформации воздухоносных путей и приводят к бронхоконстрикции.

Заключение

Структурно-функциональные изменения при БА и ХОБЛ относятся к различным морфологическим фенотипам. Для БА характерно аллергическое воспаление с инфильтрацией слизистой оболочки эффекторными клетками и развитием бокаловидноклеточной гиперплазии. Доминирующими процессами в бронхиальной стенке у больных ХОБЛ являются хроническое нейтрофильное воспаление и реакции на повреждение эпителия — пролиферация базальных клеток и плоскоклеточная метаплазия.

Литература

1. Чучалин А.Г. (ред.). Руководство по диагностике, лечению и профилактике бронхиальной астмы. М.: Агар; 2005.

2. Kariyawasam H.H., Robinson D.S. Airway remodeling in asthma: models and supermodels. Clin. Exp. Allergy 2005; 35: 117–121.
3. Isajevs S., Taivans I., Strazda G. et al. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. Eur. Respir. J. 2008; 31: 1313–1321.
4. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Workshop Report 2007. www.ginasthma.com
5. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases (GOLD). Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI / WHO workshop report. Publication Number 2701, Updated 2006. www.goldcopd.com
6. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина; 1990.
7. Kay A.B., Phipps S., Robinson D.S. et al. A role for eosinophils in airway remodeling in asthma. Trends Immunol. 2004; 25: 477–482.
8. Boulet L.P., Sterk P.J. Airway remodelling: the future. Eur. Respir. J. 2007; 30: 831–834.
9. Drakopanagiotakis F., Xiferti A., Polychronopoulos V. et al. Apoptosis in lung injury and fibrosis. Eur. Respir. J. 2008; 32: 1631–1638.
10. Gualano R.C., Vlahos R., Anderson G.P. et al. What is the contribution of respiratory viruses and lung proteases to airway remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Pulm. Pharmacol. Ther. 2006; 19: 18–23.
11. Sundy J.S., Hauswirth D.W., Mervin-Blake S. et al. Smoking is associated with an age-related decline in exhaled nitric oxide. Eur. Respir. J. 2007; 30: 1074–1081.
12. Reuter S., Heinz A., Sieren M. et al. Mast cell-derived tumour necrosis factor is essential for allergic airway disease. Eur. Respir. J. 2008; 31: 773–782.
13. Esther C.R., Alexis N.E., Clas M.L. et al. Extracellular purines are biomarkers of neutrophilic airway inflammation. Eur. Respir. J. 2008; 31: 949–956.

Информация об авторах

Геренг Елена Андреевна – к. м. н., доцент кафедры морфологии и общей патологии, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ; тел.: (3822) 42-64-43; e-mail: e-gereng@mail.ru

Суходоло Ирина Владимировна – д. м. н., проф., зав. кафедрой морфологии и общей патологии СибГМУ; тел.: (3822) 42-64-43; e-mail: suhodolo@sibmail.com

Плешко Раиса Ивановна – д. м. н., проф. кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ; (3822) 42-64-43; e-mail: raisap57@mail.ru

Огородова Людмила Михайловна – д. м. н., проф., член-корр. РАМН, заслуженный деятель науки, проректор по НР и ПП, заведующая кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ; (3822) 53-23-04; e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Букреева Екатерина Борисовна – д. м. н., проф. кафедры внутренних болезней педиатрического факультета СибГМУ; тел.: (3822) 41-98-44; e-mail: kbukreeva@mail.ru

Дзюман Анна Николаевна – к. м. н., доцент кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ; тел.: 8 (3822) 42-64-43; e-mail: dzyuman@mail.ru

Кремис Иван Сергеевич – врач пульмонологического отделения 3-й городской больницы Томска; тел.: (3822) 41-98-44

Еремина Татьяна Александровна – врач-эндоскопист 3-й городской больницы Томска; тел.: (3822) 41-87-78; e-mail: alisa94@mail.ru

Поступила 18.02.09

© Коллектив авторов, 2009

УДК [616.248+616.24-036.12]-07:616.233-018.25-091