

Е.А.Геренг¹, И.В.Суходоло¹, Л.М.Огородова², Р.И.Плешко¹, Л.И.Волкова³, О.В.Козина², П.А.Селиванова²,
А.Н.Дзюман¹, О.Е.Акбашева⁴

Роль клеточных и молекулярных мишеней в формировании различных паттернов воспаления при гетерогенных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы

1 – кафедра морфологии и общей патологии ГОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет Росздрава": 634050, Томск, Московский тракт, 2, стр. 7;

2 – кафедра факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет Росздрава": 634050, Томск, ул. К.Маркса, 44;

3 – кафедра внутренних болезней педиатрического факультета ГОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет Росздрава": 634000, Томск, пер. Нахимова, 3;

4 – кафедра биохимии и молекулярной биологии ГОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет Росздрава": 634050, Томск, Московский тракт, 2, стр. 7

E.A.Gereng, I.V.Suhodolo, L.M.Ogorodova, R.I.Pleshko, L.I.Volkova, O.V.Kozina, P.A.Selivanova, A.N.Dzyuman, O.E.Akbasheva

Role of cellular and molecular markers in development of different inflammation patterns in heterogeneous phenotypes of severe bronchial asthma

Summary

A comparative morphological investigation of bronchial biopsies and biochemistry of bronchial lavage fluid were performed in patients with different phenotypes of severe bronchial asthma. Severe difficult-to-treat "brittle" asthma had atopic features with eosinophilic inflammation in the bronchial mucosa and increased activity of alpha-1-proteinase inhibitor. Prevalent morphological and biochemical markers of asthma with poorly reversed obstruction were atrophy and neutrophilic type of inflammation with increased activity of elastase and decreased function of elastase inhibitor.

Key words: severe bronchial asthma, morphological investigation, inflammation patterns, biochemical markers.

Резюме

В работе проводилось сравнительное морфологическое исследование бронхобиоптатов слизистой оболочки бронхов и биохимический анализ бронхиальных смывов у пациентов с различными клиническими фенотипами тяжелой бронхиальной астмы (БА). Тяжелая терапевтически-резистентная БА *brittle*-фенотипа сопровождается развитием атопической формы заболевания с эозинофильным паттерном воспаления в слизистой оболочке бронхов и повышением функционирования эластазы и α_1 -протеиназного ингибитора. Доминирующими морфологическими и биохимическими маркерами БА с фиксированной обструкцией являются атрофия эпителиального пласта с развитием нейтрофильного типа воспаления, а также повышением активности эластазы и снижением функциональных свойств ее ингибитора.

Ключевые слова: тяжелая бронхиальная астма, морфологическое исследование, паттерны воспаления, биохимические маркеры.

Проблеме бронхиальной астмы (БА) посвящено множество работ, однако вопросы патогенетической и биохимической основ данного заболевания продолжают дискутироваться. Особое внимание уделяется тяжелой терапевтически резистентной форме. Существуют несколько вариантов тяжелой БА: гормонозависимая, сопровождающаяся фиксированной бронхиальной обструкцией (*asthma with fixed obstruction*); нестабильная (или "хрупкая"; *brittle asthma*); фатальная (*fatalis asthma*) [1]. Эти фенотипы различаются как клиническими, так и функциональными показателями. Можно предположить, что подобная гетерогенность опосредована разными тканевыми, клеточными и молекулярными механизмами, определяющими специфичность развития данных форм заболевания.

Особое значение в развитии эпителиального повреждения и легочного фиброза при БА имеет нейт-

рофильная эластаза. Функционирование этого фермента зависит от структурной организации и активности α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ) [2, 3]. Участие этих биохимических маркеров в развитии гетерогенных воспалительных реакций в слизистой оболочке бронхов при различных клинических фенотипах БА остается малоизученным.

До сих пор не определены окончательно морфологические и биохимические критерии формирования тяжелых терапевтически резистентных форм БА. Остается открытым вопрос о существовании и значимости взаимосвязи между морфологическими особенностями слизистой оболочки бронхов и биохимическими маркерами в жидкости бронхоальвеолярного лаважа и их значение при БА фенотипа *brittle* и БА с фиксированной бронхиальной обструкцией.

Цель данного исследования заключается в изучении и сопоставлении морфологических параметров

бронхобиоптатов и биохимического профиля бронхиальных смывов при различных фенотипах тяжелой терапевтически-резистентной формы БА.

Материалы и методы

Проведено одномоментное сравнительное исследование пациентов обоего пола с БА фенотипа *brittle* ($n = 10$) и хронической БА с фиксированной бронхиальной обструкцией ($n = 8$) в возрасте от 28 до 62 лет (средний возраст — $54,30 \pm 8,22$ года). Длительность заболевания составила $9,89 \pm 5,12$ года. Диагноз и степень тяжести БА верифицировали согласно критериям GINA (2006). Группу сравнения составили больные с БА средней степени тяжести ($n = 10$). Все пациенты на момент обследования находились в стационаре и соответствовали следующим критериям отбора:

1. Среднетяжелая БА: на фоне базисной терапии беклометазона дипропионатом или эквивалентом в дозе ≤ 500 мкг в сутки симптомы соответствовали персистирующей БА (дневные — чаще 1 раза в нед., но реже 1 раза в день, ночные — чаще 2 раз в месяц, но реже 1 раза в нед.).
2. БА фенотипа *brittle*, подтвержденная медицинскими документами (диагноз лабильной формы заболевания должен был быть подтвержден не ранее чем за 1 год до участия пациента больного в исследовании): суточная вариабельность уровня пиковой скорости выдоха (ПСВ) с амплитудой $> 40\%$ в течение более половины 5-месячного периода на фоне максимально интенсивного лечения с применением высоких доз ингаляционных глюкокортикостероидов (ГКС): прием беклометазона в дозе $> 1,5$ мг в сутки, или будесонида $> 1,0$ мкг в сутки, или флутиказона пропionato $> 0,75$ мг в сутки, частые ингаляции бронхолитиков).
3. БА с "фиксированной обструкцией": постоянная персистенция симптомов БА, низкие показатели функции внешнего дыхания (объем форсированного выдоха за 1-ю с — ФВД $\leq 60\%$ долж., ПСВ $< 60\%$ долж.) с эпизодами внезапного ухудшения, требующими назначения системных ГКС (50–20 мг в сутки по преднизолону в течение не менее 1 года), или без них. При этом терапевтический ответ должен быть неполным.
4. До проведения любых процедур, связанных с данным исследованием, каждый больной подписывал информированное согласие (одобрено локальным комитетом по этике ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава № 877 от 10.11.08).

Чтобы получить образцы бронхов и бронхиальных смывов (БС), всем больным выполняли бронхофиброскопию по стандартной методике гибким фиброскопом BF1T20 (*Olympus Corporation*, Япония) [4]. Биоптаты слизистой оболочки бронхов (2–3 фрагмента) забирали методом щипковой биопсии из среднедолевого бронха правого легкого. Процедуру бронхиального лаважа осуществляли через тубус бронхоскопа путем дробного введения изото-

нического раствора хлорида натрия (общим объемом 40–60 мл) с последующей аспирацией в стерильный силиконизированный контейнер [4]. Гистологический материал фиксировали в 10%-ном забуференном формалине, обезжизняли в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин по стандартной методике, препараты окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону. Морфометрическое исследование выполняли с использованием компьютерной программы *ImageJ 3.16*. С помощью метода точечного счета Автандилова в бронхобиоптатах определяли объемную плотность покровного эпителия и отдельных клеточных форм ($\text{мм}^3/\text{см}^3$), высоту эпителия и толщину базальной мембраны (мкм), относительный объем соединительной ткани и желез (%). В 1 мм^2 среза подсчитывали плотность воспалительного инфильтрата и различных клеточных популяций. Для биохимических исследований 1 мл БС смешивали с 1 мл физиологического раствора, подвергали 1-кратному замораживанию и оттаиванию, центрифугировали 15 мин при 3 000 об./мин. В надосадочной жидкости определяли активность эластазы и α_1 -ПИ. Активность эластазы измеряли по скорости гидролиза N-бутилоксикарбонил-L-алинин- ρ -нитрофенилового эфира (БАНЭ) и выражали в нмоль БАНЭ в минуту на 1 мл БС. Активность α_1 -ПИ определяли по торможению гидролиза N-бензоил-L-аргинин-этилового эфира трипсином и выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ/мл) [5].

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ *Statistica 6.0*. с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представляли в виде медианы (*Me*), меру рассеивания — в виде квартильного интервала ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Оценку взаимосвязи между различными морфологическими и биохимическими параметрами осуществляли с помощью подсчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (*r*).

Результаты

При бронхоскопическом исследовании у всех пациентов со среднетяжелой БА и с *brittle*-фенотипом тяжелой БА констатировали наличие хронического катарального эндобронхита, с морфологическими признаками гиперсекреции и дистонии среднедолевых бронхов. Хроническая БА с фиксированной бронхиальной обструкцией отличалась развитием катарально-склеротической или атрофической формы бронхита.

В клеточном инфильтрате слизистой оболочки бронхов у пациентов с тяжелой формой БА *brittle*-фенотипа преобладали макрофаги, лимфоциты, плазматические клетки и эозинофилы. Вместе с тем общее число данных клеточных форм у этих пациентов было ниже, чем при среднетяжелой форме заболевания. У больных БА с фиксированной бронхиальной обструкцией, по сравнению со среднетяжелой формой и *brittle*, в бронхобиоптатах обнаружено достоверное ($p = 0,0008$) повышение уровня нейтрофилов

Таблица 1
Клеточный состав инфильтрата слизистой оболочки бронхов у больных с различными фенотипами тяжелой БА, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Плотность инфильтрата в 1 мм ²	БА средней тяжести, n = 10	БА фенотипа <i>brittle</i> , n = 10	Хроническая БА с фиксированной бронхиальной обструкцией, n = 8
Макрофаги	62,5 (43,6–72,4)	52,8 (49,5–60,5)	25,0 (18,7–26,7)**,*
Лимфоциты	52,5 (34,8–62,5)	44,5 (37,5–68,5)*	64,2 (52,5–69,5)**
Плазмоциты	18,5 (16,5–22,5)	23,7 (21,6–32,8)	10,4 (8,7–13,5)**,*
Нейтрофилы	28,9 (23,5–47,8)	24,6 (13,5–28,6)	97,4 (85,5–118,3)**,*
Эозинофилы	21,7 (23,5–35,7)	15,9 (15,5–17,5)*	4,7 (2,6–7,5)**,*

Примечание: здесь и в табл. 2 и 3 * – достоверность различий ($p < 0,05$) параметров у пациентов со среднетяжелой формой БА и с тяжелой БА фенотипа *brittle*; ** – достоверность различий ($p < 0,05$) параметров пациентов со среднетяжелой формой БА и больных хронической БА с постоянной бронхиальной обструкцией; *** – достоверность различий ($p < 0,05$) параметров пациентов с тяжелой БА фенотипа *brittle* и больных хронической БА с постоянной бронхиальной обструкцией.

на фоне снижения общего количества гистио-макрофагальных клеточных элементов (табл. 1).

При морфометрическом исследовании биоптатов слизистой оболочки бронхов у пациентов с тяжелой формой БА *brittle*-фенотипа, по сравнению со среднетяжелой формой заболевания, выявлено достоверное ($p = 0,0015$) увеличение высоты эпителиального пласта и относительного объема соединительной ткани в подслизистой оболочке бронхов. БА с фиксированной бронхиальной обструкцией отличалась от среднетяжелой и от *brittle*-фенотипа достоверным ($p = 0,0006$) снижением объемной плотности покровного эпителия и отдельных клеточных представителей на фоне уменьшения высоты эпителия. В бронхобиоптатах при БА с фиксированной бронхиальной обструкцией, по сравнению с 2 другими фенотипами, отмечалось утолщение базальной мембраны при увеличении относительного объема соединительной и снижении относительного объема железистой ткани в подслизистой оболочке бронхов (табл. 2).

При биохимическом анализе БС у больных тяжелой БА *brittle*, по сравнению со среднетяжелой, установлено статистически значимое ($p = 0,0012$) повы-

шение функциональной активности эластазы и ее ингибитора (табл. 3). Результаты биохимического исследования лаважной жидкости у пациентов, страдающих БА с фиксированной обструкцией, по сравнению со среднетяжелой формой и *brittle*-фенотипом, продемонстрировали выраженное усиление протеолитических свойств эластазы до 4,43 (3,62–7,36) нмоль БАНЭ мин/мл и падение α_1 -ПИ до 0,08 (0,07–0,09) ИЕ/мл.

При оценке взаимосвязи морфологических и биохимических параметров у пациентов с *brittle*-фенотипом тяжелой БА обнаружены статистически значимые ($p = 0,009$) прямые корреляционные связи между плотностью эозинофилов и толщиной базальной мембраны, активностью эластазы и объемной плотностью бокаловидных эпителиоцитов (рисунок). Результаты корреляционного анализа показали, что у больных БА с фиксированной обструкцией активность эластазы находится в статистически значимой ($p = 0,001$) положительной взаимосвязи с объемной плотностью покровного эпителия, высотой эпителиального пласта и количеством нейтрофилов. Общее число макрофагов у этой группы пациентов

Таблица 2
Морфометрические показатели слизистой оболочки бронхов при различных клинических фенотипах тяжелой формы БА, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатель	БА средней тяжести, n = 10	БА фенотипа <i>brittle</i> , n = 10	Хроническая БА с фиксированной бронхиальной обструкцией, n = 8
Объемная плотность покровного эпителия, мм ³ /см ³	346,2 (322,5–400,8)	318,2 (294,7–224,5)	213,4 (197,3–257,6)**,*
Объемная плотность реснитчатых эпителиоцитов, мм ³ /см ³	180,3 (148,9–220,9)	158,9 (147,8–152,6)	104,5 (102,7–108,6)**,*
Объемная плотность бокаловидных эпителиоцитов, мм ³ /см ³	110,3 (87,3–123,4)	97,5 (97,4–107,5)	69,2 (56,4–89,4)**,*
Объемная плотность базальных эпителиоцитов, мм ³ /см ³	62,4 (43,2–73,4)	57,5 (51,2–63,5)	39,0 (36,4–56,8)**
Относительный объем желез, %	56,2 (46,3–63,5)	46,4 (45,5–50,3)*	17,7 (15,5–24,5)**,*
Относительный объем соединительной ткани, %	43,8 (36,4–53,6)	53,5 (49,7–54,5)*	82,2 (74,5–84,5)**,*
Высота эпителиального пласта, мкм	54,5 (43,5–63,5)	75,7 (68,7–79,6)*	20,2 (18,6–27,6)**,*
Толщина базальной мембраны, мкм	10,5 (9,5–15,4)	15,6 (9,2–16,5)	16,7 (12,5–17,8)**

Таблица 3
Активность эластазы и ее ингибитора в лаважной жидкости при различных клинических фенотипах тяжелой формы БА, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатель	БА средней тяжести, n = 10	БА фенотипа <i>brittle</i> , n = 10	Хроническая БА с фиксированной бронхиальной обструкцией, n = 8
Активность эластазы, нмоль БАНЭ мин/мл	0,56 (0,46–0,54)	0,83 (0,64–0,85)*	4,43 (3,62–7,36)**,*
α_1 -ПИ, ИЕ/мл	0,27 (0,14–0,28)	0,43 (0,39–0,47)*	0,08 (0,07–0,09)**,*

статистически значимо ($p = 0,007$) коррелировало с активностью α_1 -ПИ (рисунок).

Обсуждение

Клинико-функциональная гетерогенность тяжелой формы БА во многом обусловлена воспалительной реакцией в дыхательных путях с последующей структурной перестройкой стенки бронха. В соответствии с данными последних исследований выделено 2 паттерна воспаления, определяющих развитие тяжелой неконтролируемой (терапевтически-резистентной) БА [1]. Фенотип *brittle* тяжелой БА отличается развитием эозинофильной модели воспаления в слизистой оболочке бронхов, что в настоящем исследовании подтверждается увеличением общего количества лимфоцитов и эозинофилов (табл. 1). Значимая роль эозинофильных гранулоцитов в патогенезе тяжелой нестабильной формы БА *brittle*-фенотипа связана как с токсическим влиянием основного протеина, продуцируемого эозинофилами, на эпителий и базальную мембрану, так и с выработкой профиброзных ростовых факторов, которые стимулируют пролиферацию и дифференцировку фибробластов и коллагеногенез [1, 6, 7]. На это указывает выявленная положительная корреляция между плотностью эозинофилов и толщиной базальной мембраны ($r = 0,57$). У пациентов с *brittle*-фенотипом тяжелой БА установлено параллельное повышение функциональной активности нейтрофильной эластазы и ее ингибитора. Известно, что эластаза стимулирует бокаловидноклеточную гиперплазию, что подтверждается в данном исследовании положительной корреляцией между активностью эластазы и объемной плотностью бокаловидных эпителиоцитов. Вероятно, совокупность фибропластических и протеолитических процессов приводит к развитию нестабильной формы БА с формированием выраженного бронхообструктивного синдрома [1, 2].

БА с фиксированной обструкцией характеризуется увеличением общего количества нейтрофилов с одновременным повышением функциональной активности эластазы. Нейтрофильная эластаза может снижать пролиферативную и метаболическую активность базальных эпителиоцитов, что приводит к развитию деструктивных нарушений слизистой оболочки бронхов с атрофией эпителиального пласта [2, 4]. В настоящем исследовании это подтверждается снижением высоты покровного эпителия с одновременным снижением его объемной плотности. Можно предположить, что эластаза при данном фенотипе тяжелой БА усиливает выработку макрофагами лейкотриена В₄. Это вносит существенный вклад в развитие бронхиальной гиперреактивности и резистентности к терапии ГКС. Повышенная активность эластазы у больных с фенотипом БА с фиксированной обструкцией также может быть связана с падением функционирования ее ингибитора. Известно, что α_1 -ПИ поступает в бронхиальное дерево как путем пассивной диффузии из плазмы, так и секретируется местно гистиомакрофагальными клеточными элементами [3]. Последнее подтверждается положительной корреляцией между количеством макрофагов и активностью ингибитора ($r = 0,56$; $p = 0,007$). Таким образом, снижение ингибиторных свойств α_1 -ПИ при БА может быть связано и с нарушением его образования в макрофагах, количество которых меньше у больных БА с фиксированной бронхиальной обструкцией, по сравнению с *brittle*-фенотипом тяжелой терапевтически-резистентной БА.

Заключение

Тяжелая терапевтически-резистентная БА *brittle*-фенотипа сопровождается развитием атопической формы заболевания с формированием эозинофильного паттерна воспаления в слизистой оболочке бронхов

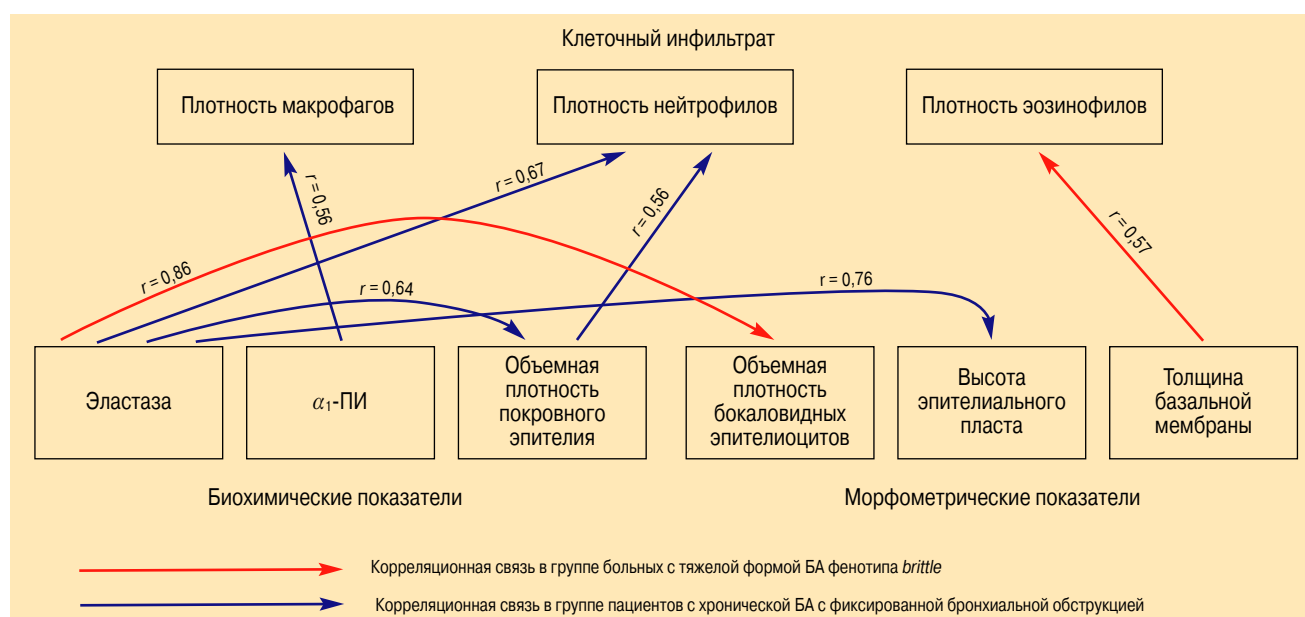


Рисунок. Результаты корреляционных взаимосвязей между клинико-функциональными, цитологическими и биохимическими показателями индуцированной мокроты при тяжелой форме БА фенотипа *brittle* и с постоянной бронхиальной обструкцией

и повышением функционирования эластазы и α_1 -ПИ. Доминирующими морфологическими и биохимическими маркерами БА с фиксированной обструкцией являются атрофия эпителиального пласта с развитием нейтрофильного типа воспаления, а также повышением активности эластазы и снижением функциональных свойств ее ингибитора.

Данное исследование выполнено при частичной финансовой поддержке грантов ФЦП (госконтракты 02.740.11.0083; 02.512.11.2281), 6-й рамочной программы Евросоюза (GABRIEL Proposal 018996).

Литература

1. Wenzel S.E., Schwartz L.B., Langmack E.L. et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160: 1001–1008.
2. Аверьянов А.В., Поливанова А.Э. Нейтрофильная эластаза и болезни органов дыхания. Цитокины и воспаление 2007; 6 (4): 3–8.
3. Aldonyte R., Hutchinson E., Jin B. et al. Endothelial alpha-1-antitrypsin attenuates cigarette smoke induced apoptosis in vitro. *Eur. Respir. J.* 2008; 5 (3): 153–162.
4. Непомнящих Г.И. Биопсия бронхов: морфогенез общепатологических процессов в легких. М.; 2005.
5. Нартикова В.Ф. Унифицированный метод определения активности α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека. Вопросы медицинской химии 1979; 25 (4): 494–499.
6. Boulet L.P., Sterk P.J. Airway remodelling: the future. *Eur. Respir. J.* 2007; 306 (2): 831–834.
7. DiCamillo S.J., Shenghong Y., Panchenko M. et al. Neutrophil elastase-initiated EGFR/MEK/ERK signaling counteracts stabilizing effect of autocrine TGF- β on tropoelastin mRNA in lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006; 291: 8: 232–243.

Информация об авторах

Геренг Елена Андреевна – к. м. н., доцент кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ, старший научный сотрудник ЦНИЛ 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

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

Плешко Раиса Ивановна – д. м. н., проф. кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ; тел.: (3822) 42-64-43; e-mail: raisaP57@mail.ru

Волкова Людмила Ивановна – д. м. н., проф., зав. кафедрой внутренних болезней педиатрического факультета; тел.: (3822) 41-98-44; e-mail: volkova@mail.ru

Козина Ольга Владимировна – к. м. н., доцент кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ; тел.: (3822) 51-49-67; e-mail: okozina@mail.ru

Селиванова Полина Александровна – к. м. н.; ассистент кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета; тел.: (3822) 51-49-67; e-mail: polina_selivanova@mail.ru

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

Акбашева Ольга Евгеньевна – к. м. н., доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ; тел.: (3822) 42-09-22; e-mail: akbashova@jandex.ru

Поступила 06.07.09

© Коллектив авторов, 2009

УДК 616.248-036.17-092