

М.В.Зуга, В.А.Невзорова, В.Ф.Баранов, Б.И.Гельцер

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ДИАФОРАЗЫ ЭПИТЕЛИЯ БРОНХОВ И ИХ ПОДВИЖНОСТЬ ПРИ ИНГАЛЯЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА

Кафедра гистологии, кафедра пропедевтики внутренних болезней Владивостокского
медицинского университета

NADPHN-DIAPHORASE ACTIVITY OF THE BRONCHIAL EPITHELIUM AND BRONCHIAL MOBILITY WITH THE ACETILCHOLINE INHALATION

M.V.Zuga, V.A.Nevzorova, V.F.Baranov, B.I.Geltser

Summary

The NADPHN-diaphorase activity of the bronchial epithelium and bronchus mobility were studied for the healthy rats and the rats sick with parasitogenic pneumonia. The both groups took acetylcholine inhalation. It was found out that the ferment activity grew for the both groups. However the bronchus mobile response differed. The relaxation was observed for the healthy rats and the constriction — for the sick ones. Preliminary atropine injection blocks these effects up.

Резюме

Исследовалась активность НАДФН-диафразы эпителия бронхов и их подвижность у здоровых и больных паразитарной пневмонией крыс при ингаляции ацетилхолина. Установлено, что в обеих группах животных активность фермента повышается при неоднозначной двигательной реакции бронхов — релаксации у здоровых и констрикции у больных. Предварительное введение атропина блокирует эти эффекты.

Оксид азота (NO) рассматривается в настоящее время как универсальный мессенджер многих физиологических процессов [4]. Открытая первоначально как регулятор сосудистой подвижности, она за последние годы изучается в этом качестве применительно ко всем трубчатым органам, стенка которых содержит гладкую мышечную ткань [16,18]. Исследованию NO и образующих ее ферментов в бронхах придается особое значение в связи с их аэротранспортной функцией, часто страдающей у человека. Однако полученные данные не дают однозначного ответа на вопрос о значении NO в регуляции проходимости бронхов [10, 13,17]. Поэтому цель настоящего исследования состояла в том, чтобы попытаться установить соотношение между активностью НАДФН-диафразы, образующей NO, и способностью бронхов изменять ширину просвета при стимуляции их слизистой оболочки ацетилхолином.

Опыты проведены на здоровых и больных паразитарной интерстициальной пневмонией (*pneumonia pneumocystica*) беспородных крысах-самцах, массой 200—250 г. Больных и здоровых животных разделили на группы: контрольные и опытные. Крысам ингалировали ацетилхолин в нарастающих концентрациях — 0,2, 0,4, 0,6 г/л, которым соответствовали дозы — 5,10, 15 мкг/кг. Животных помещали в полиэтиленовую камеру, соединенную с ультразвуковым ингалятором.

Ацетилхолин растворяли перед каждой ингаляцией в 5 мл изотонического раствора хлорида натрия и подавали в течение трех минут со средней скоростью 1,6 мл в минуту. Между ингаляциями выдерживали пятиминутный перерыв. Животных 1-й группы декапитировали сразу же после первой ингаляции, 2-й — после следующей и 3-й после последней. Контрольным животным ингалировали 5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Отдельные группы составили здоровые и больные крысы, которым за 10 минут до начала первой ингаляции вводился атропин (100 мг/кг). В каждую группу брали не менее трех крыс. Всего в эксперименте использовано 55 животных.

НАДФН-диафразу выявляли по прописи Hope, Vincent [14]. Участки легких размерами 1—0,5 см вырезали с помощью лезвия и опускали в охлажденный и приготовленных на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) 4% параформальдегид, в котором из всего класса диафраз сохраняется активность только НАДФН-диафразы. Материал продолжали фиксировать 2 часа при 4°C, затем сутки промывали при той же температуре в 15% растворе сахарозы. Из образцов, замороженных в криостате, изготавливали срезы толщиной 10 мкм, монитировали на предметные стекла и помещали в инкубационную среду, состав и конечная концентрация которой были следующими: 50 мМ Трис-HCl буфер (pH 8,0), 1 мМ НАДФ ("Sigma"), 0,5

РУЛИД®

ДЛЯ ДЕТЕЙ

Р О К С И Т Р О М И Ц И Н

НОВЫЙ ОРАЛЬНЫЙ АНТИБИОТИК ДЛЯ ДЕТЕЙ



КОНТРОЛИРУЕМАЯ СИЛА ЭФФЕКТИВНОГО МАКРОЛИДА



- ПРЕВОСХОДСТВО ПО СРАВНЕНИЮ
С КЛАССИЧЕСКИМИ МАКРОЛИДАМИ
В ОТНОШЕНИИ БИОДОСТУПНОСТИ
И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ
- ПОДТВЕРЖДЕННОЕ ЭФФЕКТИВНОЕ
ДЕЙСТВИЕ НА ВСЕ МИКРООРГАНИЗМЫ,
ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ ПРИ ИНФЕКЦИЯХ
ДЫХАТЕЛЬНОГО ТРАКТА И КОЖНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ

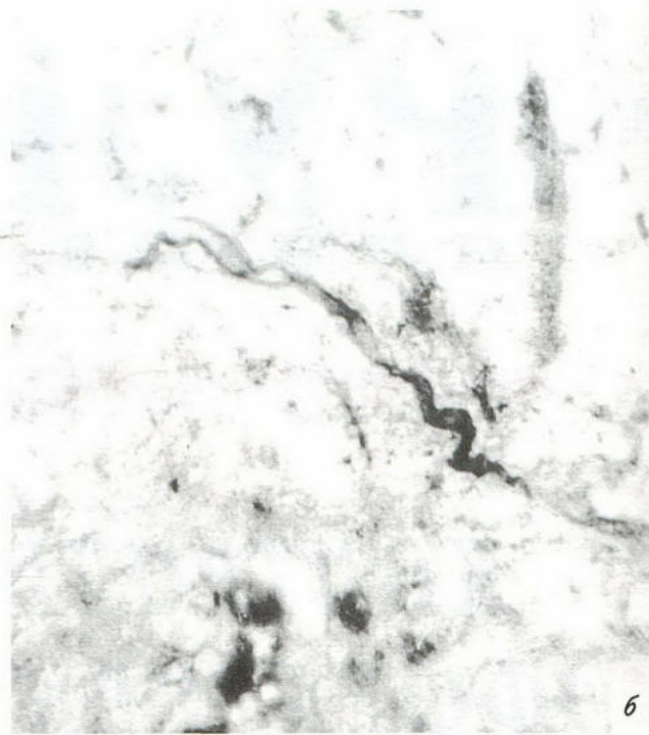
- ИСКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕНОСИМОСТЬ

Курс лечения успешно прошли 60 миллионов пациентов,
взрослых и детей, более чем в 80 странах мира

Хёхст Мэрион Руссель



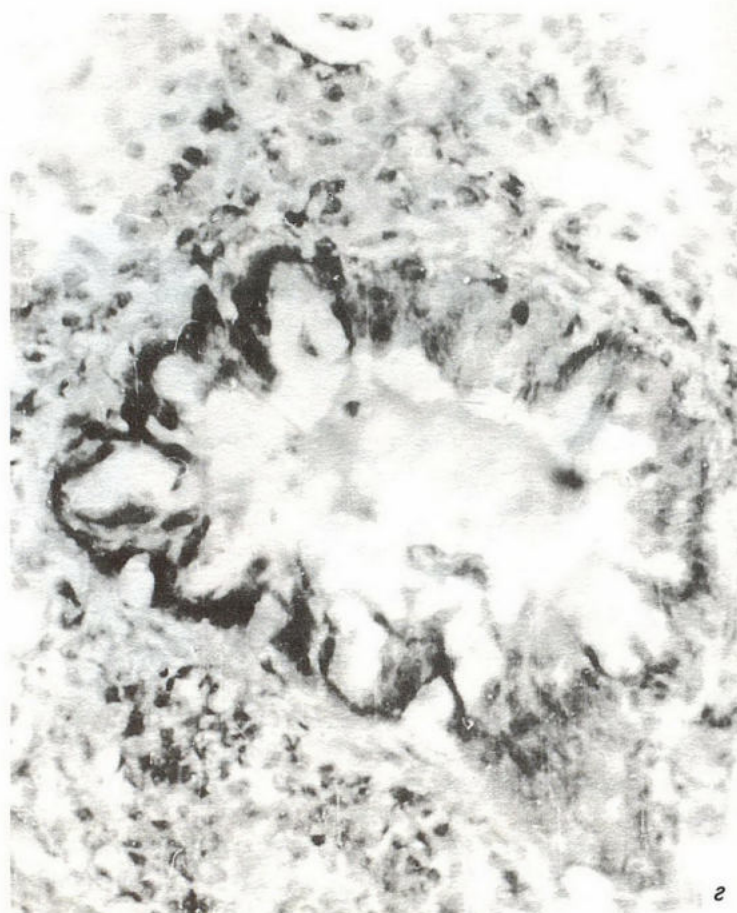
а



б



в



г

Рис.1. Топография НАДФН-диафоразы в легких крысы.

а — артерия 300 мкм, фермент локализован в эндотелии сосуда; б — нитринергический нерв в адвентиции бронха; в — бронх 200 мкм, фермент локализован в эпителии. а, б, в — метод *Hope-Vincent* на диафору. $\times 200$. г — бронх крысы 350 мкм при пневмоцистной пневмонии: обтурация просвета слизистым секретом, гиперплазия бокаловидных клеток, перибронхит. Окраска по Романовскому. $\times 200$.

мМ нитросинего тетразолия ("Sigma") и 0,2% Тритон X-100 ("Serva"). Инкубацию проводили в течение 60 минут при 37°C, после чего срезы ополаскивали в дистилляте, обезживали и заключали в бальзам по общепринятой методике. В качестве контроля в инкубационную среду вводили 1 мМ нитро-L-аргинина, элективного ингибитора НАДФН-диафоразы, при этом срезы оставались прозрачными либо окрашивались в светло-розовый цвет за счет неспецифической адсорбции формазана. Активность фермента определяли на микроденситометре *Vickers M-85*. Параллельно криостатные срезы легких окрашивали по Романовскому, где производились измерения бронхов на строго поперечных срезах с помощью МОВ-1 и микроскопа фирмы "*Carl Zeiss Jena*". Констрикция или релаксация определялись как отношение диаметра просвета к диаметру бронха в процентах. Изучалась реакция преимущественно мелких бронхов диаметром 100 — 500 мкм как наиболее важных в формировании бронхиальной обструкции.

Оксид азота образуется из аминокислоты L-аргинина путем окисления одного атома азота NO-синтазой (NOC), солокализованной и зависимой от флавинового энзима НАДФН-диафоразы. Это парные ферменты, чья активность меняется однонаправленно и согласованно [1]. Их цитохимическая локализация указывает на структуры, образующие NO, а активность находится в прямо пропорциональной зависимости от количества продуцируемого клетками газа [15].

Проведенная нами цитологическая идентификация НАДФН-диафоразы в легких крыс показала, что образование NO возможно в кровеносных сосудах, нервах и бронхах. Судя по локализации диформазана — преципитата, образующегося в результате цитохимической реакции, фермент имеют эндотелиальные клетки бронхиальных артерий, вен и капилляров. В других клеточных элементах кровеносных сосудов наличие НАДФН-диафоразы не установлено (рис.1,а).

Кроме сосудистого эндотелия на фермент положительно реагируют нервные стволы толщиной от 5 до 15 мкм, содержащие нитринергические аксоны диаметром около 0,5 мкм с характерными веретеновидными вздутиями величиной 1,5—2 мкм. Нервы расположены в соединительной ткани адвентиции, по существу общей для бронха и бронхиальных кровеносных сосудов. Они окрашены в интенсивно синий цвет, что указывает на высокую активность энзима (рис.1,б).

При визуальной оценке состояния НАДФН-диафоразы в кровеносных сосудах, нервах и бронхах ее активность в последних оказывается наибольшей. Фермент локализован только в реснитчатом эпителии, остальные гистологические элементы стенки бронха его не содержат. В результате цитохимической процедуры со стороны просвета по всей окружности бронха образуется лента синего цвета, точно соответствующая положению эпителиальной выстилки (рис.1,в). Наиболее элективно у крыс, как и у человека [2], маркируются реснитчатые клетки. Содержимое ядра не окрашивается, весь диформазановый преципитат образуется исключительно в цитоплазме клетки. Согласно

литературным данным, полученным при электронно-микроскопических исследованиях, формазан окрашивает мембраны митохондрий, эндоплазматического ретикулума, оболочки ядра (главным образом ее наружную мембрану), плазмолемму и непостоянно диктиосомы аппарата Гольджи [19], в которых локализована НАДФН-диафораза.

Уровень активности НАДФН-диафоразы в эпителии крыс по количественным показателям не отличается от числовых значений фермента соответствующих морфологических структур плодов человека второй половины беременности [2]. Однозначность локализации фермента у крыс и человека позволяет рассматривать равенство его функции для обоих видов, а полученные в эксперименте на животных данные экстраполировать на человека.

При ингаляции ацетилхолина здоровым и больным животным активность диафоразы у тех и других достоверно увеличивалась. При этом исходное содержание энзима у больных превышало его значения у здоровых несмотря на существенные морфологические изменения в бронхах и легочной ткани, характерные для продуктивного воспалительного процесса. В частности, в бронхах отмечалось утолщение эпителиального пласта за счет гиперплазии и гипертрофии бокаловидных клеток, потеря реснитчатым эпителием мерцательного аппарата. В просвете бронхов слизистый секрет смешивался с клетками десквамированного эпителия. Отдельные бронхи были полностью обтурированы отслоившейся эпителиальной выстилкой, другие — умеренно расширены. По окружности бронхов воспалительные пролифераты формировались из лимфоцитов и макрофагов с примесью тучных клеток, от 1 до 15 элементов в поле зрения при увеличении в 200 раз.

Повышение активности диафоразы в эпителии измененных бронхов крыс (рис.1,г) можно сопоставить с данными исследования газового состава воздуха от больных с воспалительными заболеваниями дыхательных путей. У них отмечено значительное увеличение экспирируемых оксидов азота [8,9].

Реакция НАДФН-диафоразы на ингаляцию ацетилхолина была выражена резче у больных животных, но, как и у здоровых, она зависела от дозы препарата. У здоровых животных активность фермента достигала максимума при концентрации 0,6 г/л, а у больных верхний уровень содержания фермента устанавливался при 0,4 г/л (рис.2). Следующая доза снижала у этих животных активность фермента до исходных значений. Предварительное введение атропина полностью снимало эффекты от последующего вдыхания холиномиметика. Этот факт указывает на то, что действие ацетилхолина опосредуется через М-холинорецепторы, установленные ранее в эпителиальных клетках бронхов рядом исследователей [7].

Функцию NO как универсального мессенджера пытаются связать с регуляцией гемодинамики и иммунорезистентных процессов в легких [6,12]. В то же время влияние NO на тонус гладких миоцитов бронхов, то есть регуляцию их подвижности, способности к суже-

БИОПАРОКС®

ФУЗАФУНЖИН

ИНФЕКЦИИ
ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

*Уникальный ингаляционный препарат,
обладающий антимикробными
и противовоспалительными свойствами*

А пероральные ингаляции и
Б ингаляции через каждый
носовой ход
1 раз в день

7 основных
показаний
к применению

синусит

ринит

фарингит

тонзиллит

ларингит

трахеит

бронхит

**МЕСТНОЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ
НА ВСЕХ УРОВНЯХ ДЫХАТЕЛЬНОГО ТРАКТА**



103109, Москва,
Газетный пер., 17/9
Тел.: (095) 234 3866
Факс: (095) 234 3299



ТАЙЛЕД®

а теперь и новый

ТАЙЛЕД® МИНТ

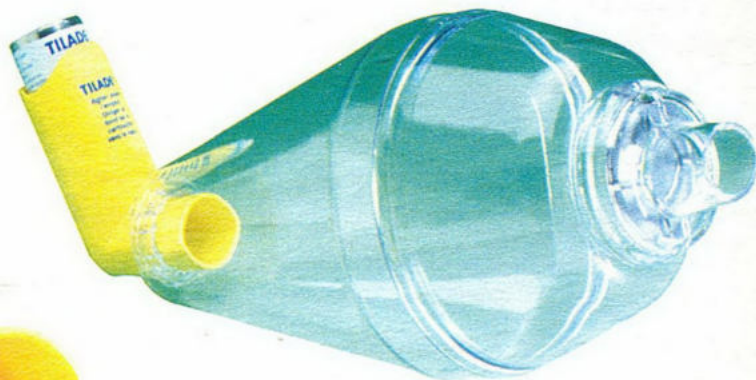
ПРЕПАРАТ ПЕРВОГО ВЫБОРА ДЛЯ БАЗИСНОЙ
ТЕРАПИИ ЛЕГКОЙ И СРЕДНЕТЕЖЕЛОЙ АСТМЫ

*Для пациентов
старше 5 лет*

**Преимущества
синхронера**

- ▲ Эффективность
- ▲ Визуальный контроль
- ▲ Приятный вкус

*Для пациентов
младше 5 лет*



Простой режим дозирования: **2** ингаляции 2 раза в день
(При необходимости дозировка может быть увеличена до 2 ингаляций 4 раза в день)

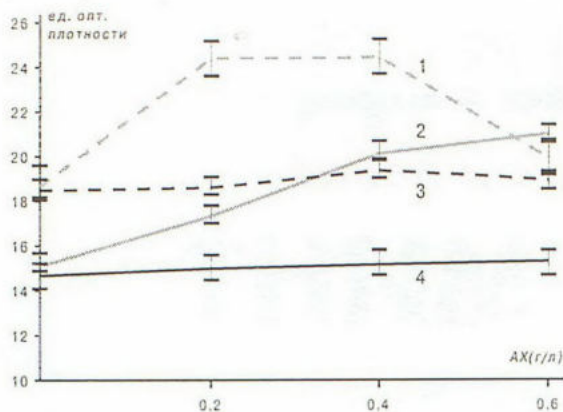


Рис.2. Активность НАДФН-диафоразы в эпителии бронхов при ингаляции ацетилхолина (АХ) больным и здоровым крысам, до и после введения атропина. По вертикали — оптическая плотность фермента. По горизонтали — концентрация АХ. Повышение активности НАДФН-диафоразы на вдыхание АХ по сравнению с исходным уровнем статистически достоверно ($p<0,05$). Здесь и на рис.3. 1 — больные-АХ, 2 — здоровые-АХ, 3 — больные-атропин+АХ, 4 — здоровые-атропин+АХ.

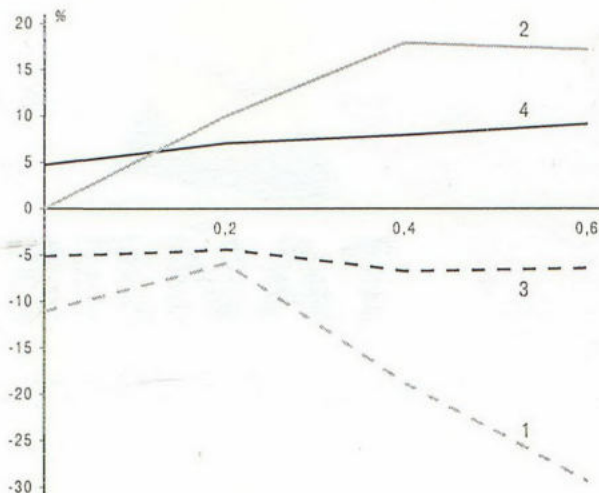


Рис.3. Подвижность бронхов при ингаляции ацетилхолина. По вертикали вверх — процент релаксации, вниз — процент констрикции. Различия реакции бронхов на повышение концентрации АХ статистически достоверны ($p<0,05$).

нию и релаксации, остается недостаточно ясной [20]. Решение этой проблемы имеет особое значение, так как обещает в ближайшем будущем получить новую группу фармакологических препаратов, влияющих на бронхиальную проходимость и кровообращение в легких.

Данные, приведенные на рис.3, показывают, что у здоровых животных под влиянием ацетилхолина наступает релаксация бронхов, достигающая максимальной величины при дозе 0,4 г/л. У больных крыс при минимальной дозе отмечается попытка к расширению просвета, сменяющаяся прогрессирующим сужением, прямо пропорциональным активности фермента. Следовательно, повышение активности НАДФН-диафоразы у здоровых и больных животных приводит к диаметрально противоположным результатам — релаксации у первых и констрикции у вторых.

Чем же можно объяснить столь неоднозначную реакцию? За ответом, видимо, следует обратиться к довольно хорошо изученной на NO реакции кровеносных сосудов. Furchgott и Zawadzki в 1980 г. [11], а вслед за ними и другие [3] показали, что при структурно-функциональной целостности эндотелия ацетилхолин релаксирует кровеносные сосуды. При повреждении же эндотелия холинолитик в 100% случаев суживает просветы как артерий, так и вен.

Следует, вероятно, с большей долей достоверности предположить, что в бронхах, в зависимости от их состояния, совершается то же самое. При сохранном здоровом эпителиальном покрове происходит релаксация, а при дистрофии эпителиоцитов, особенно при десквамации, возможна констрикция. Исследования, проведенные на дезэпителизированных препаратах трахеи и бронхов [5], свидетельствуют о том, что их слизистая оболочка обладает эффективной системой регуляции тонуса гладкой мускулатуры дыхательных путей.

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что NO обеспечивает физиологическую проходимость бронхов, а вдыхаемый воздух является естественным раздражителем эпителиоцитов, поддер-

живающих пороговый тонус гладких мышечных клеток через нитринергический механизм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты — М.: Мир, 1968. — 816 с.
2. Зуга М.В., Калинин С.Г., Невзорова В.А., Архипенко И.В. НАДФН-диафараза в эпителии бронхов плодов человека // Пульмонология. — 1996. — № 1. — С.68—71.
3. Мотавкин П.А. Современные представления о механизмах регуляции мозгового кровообращения // Морфология. — 1992. — Т.103, № 7—8. — С.7—34.
4. Реутов В.П., Орлов С.Н. Физиологическое значение гуанилатциклазы и роль окиси азота и нитросоединений в регуляции активности этого фермента // Физиология человека. — 1993. — Т.19, № 1. — С.124—135.
5. Хавинсон В.Х., Кожмякин А.Л., Федин А.Н., Фомичев С.Н. Релаксирующее действие олигопептидов, выделенных из слизистой трахеи и легочной паренхимы, на гладкую мускулатуру изолированной трахеи крыс // Бюл. exper. биол. — 1992. — № 5. — С.483—486.
6. Adnot S., Raffestin B., Eddahibi S. NO in the lung // Respir. Physiol. — 1995. — Vol.101, № 2. — P.109—120.
7. Barnes P.J. Airway epithelial receptors // Eur. Respir. Rev. — 1994. — Vol.4, № 23. — P.371—379.
8. Barnes P.J., Liew F.Y. Nitric oxide and asthmatic inflammation // Immunol. Today. — 1995. — Vol.16, № 3. — P.128—130.
9. Belvisi M., Barnes P.J., Larkin S., Yacoub M., Tadjkarimi S., Williams T.S., Mitchell J.A. Nitric oxide synthase activity is elevated in inflammatory lung disease in humans // Eur. J. Pharmacol. — 1995. — Vol.283, № 1—3. — P.255—258.
10. Dupuy H.M., Shore S.A., Drazen J.M. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea-pig // J. Clin. Invest. — 1992. — Vol.90. — P.421—428.
11. Furchgott R.F., Zawadzki S. The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin // Nature. — 1980. — Vol.288. — P.373—376.
12. Gutierrez H.H., Pitt B.R., Watkins S.T. 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—L507.
13. Hogman M., Flostell C.G., Arnberg H., Hedenstierna G. Inhalation of nitric oxide modulates methacholine-induced bronchoconstriction in the rabbit // Eur. Respir. J. — 1993. — Vol.6. — P.177—180.
14. Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // J. Histochem. Cytochem. — 1989. — Vol.37. — P.653—661.

15. Hope B.T., Michael G.T., Knigge K.M., Vincent S.R. Neuronal NADPH-diaphorase in a nitric oxide synthase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1991.— Vol.88.— P.2811—2814.
16. Kobzir K., Drazen J., Bredt D. et al. Nitric oxide synthase (NOS) in the lung: immunologic and histochemical localization in human and rat tissue // Am. Rev. Respir. Dis.— 1993.— Vol.147.— P.A 515.
17. Munakata M., Masaki Y., Saxuma I. Pharmacological differentiation of epithelium-derived relaxing factor from nitric oxide // J. Appl. Physiol.— 1990.— Vol.69.— P.665—670.
18. Schmidt H.H.W., Gagne G.D., Nakane N., Pollock J.S., Miller M.F., Murad F. Mapping of Neural Nitric oxide synthase in the Rat Suggests Frequent Co-localization with NADPH Diaphorase but Not with Soluble Guanylyl Cyclase, and Novel Paraneural Functions for Nitrinergic Signal Transduction // J. Histochem. Cytochem.— 1992.— Vol.40, № 10.— P.1439—1456.
19. Wolf G., Wurdig S., Shunzel G. Nitric oxide synthase in rat brain is predominantly located at neuronal endoplasmic reticulum: an electron microscopic demonstration of NADPH-diaphorase activity // Neurosci. Lett.— 1992.— Vol.147.— P.63—66.
20. Zhao W., Guenard H. Effect of nitric oxide on in vitro responsiveness of bovine bronchus and pulmonary vessels // Eur. Respir. J.— 1995.— Vol.8.— P.755—761.

Поступила 05.05.96.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1997

УДК 577.112.385.2+612.112.93:611.831/-092.9

М.В.Зуга, В.А.Невзорова, Т.Ю.Гарцман, Б.И.Гельцер

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ДИАФОРАЗЫ И СОСТОЯНИЕ ТУЧНЫХ КЛЕТОК БРОНХОВ ПРИ ВАГУСНОЙ ДЕАФФЕРЕНТАЦИИ ЛЕГКОГО КРЫСЫ

Кафедра гистологии, кафедра пропедевтики внутренних болезней ВГМУ

NADPHN-DIAPHORASE ACTIVITY AND THE STATE OF BRONCHIAL MAST CELLS DURING VAGAL DEAFFERENTATION OF A RAT'S LUNG

M.V.Zuga, V.A.Nevzorova, T.Yu.Gartsman, B.I.Geltser

Summary

The NADPHN-diaphorase activity was studied for the epithelium and bronchial mast cells under deafferentation caused by rats' vagus cutting. It was determined that the deafferentation results in the increase of the number of the mast cells together with their degranulation inhibition. This process also reduces the NADPHN-diaphorase activity and causes bronchus relaxation and dystrophy. The results have given evidence of the vagus nerve coordinative role in the control of the nitrinergic and mastcellular mechanisms regulating bronchus mobility.

Резюме

Исследовалось состояние НАДФН-диафоразы эпителия и тучных клеток бронхов в условиях деафферентации, вызванной перерезкой вагуса у крыс. Выяснено, что деафферентация вызывает увеличение числа и торможение дегрануляции тучных клеток, снижение активности НАДФН-диафоразы, релаксацию и дистрофические нарушения бронхов. Данные исследования свидетельствуют о координирующей роли блуждающего нерва в управлении нитринергическими и тучноклеточными механизмами регуляции подвижности бронхов.

Гладкие мышечные клетки стенки бронхов являются мишенью для окиси азота, образующейся в бронхиальном эпителии, и гистамина, секретируемого местными тучными клетками [4,5,11]. В здоровом организме эти два механизма в регуляции проходимости бронхов взаимно уравнивают друг друга: окись азота снижает, а гистамин повышает тонус гладких мышечных клеток [6,7,8]. Согласованную работу этих механизмов предположительно координирует блужда-

ющий нерв, являющийся основным источником афферентов для чувствительной иннервации легких [2].

Цель работы состояла в том, чтобы в условиях деафферентации, вызванной перерезкой вагуса, изучить состояние НАДФН-диафоразы эпителия и тучных клеток бронхов; сделать заключение о значении блуждающего нерва в координации их функций.

Исследование выполнено на нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 200—250 г, содержа-