

102. Warren J.B., Maltby N.H., McCormack D., Barnes P.J. Pulmonary endothelium-derived relaxing factor is impaired in hypoxia // Clin. Sci.— 1989.— Vol.77.— P.671—676.
103. Weir E.K. Does normoxic pulmonary vasodilatation rather than hypoxic vasoconstriction account for the pulmonary pressor response to hypoxia // Lancet.— 1978.— Vol.1.— P.476—477.
104. Weir E.K. // Pulmonary Hypertension/ Eds. E.K.Weir, J.T.Reeves.— New York: Futura, 1984.— P.251.
105. Weinbraud N.L., Chaitman B.R. Newer concepts in the medical management of patients with congestive heart failure // Clin. Cardiol.— 1993.— Vol.16.— P.380—390.
106. Weismann D.N., Williamson H.E. Hypoxemia increases renal secretion rate in anaesthetised newborn lambs // Life Sci.— 1981.— Vol.29.— P.1887—1893.

Поступила 11.11.96

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1996

УДК [616.233.018.7—008.931]:618.32

М.В.Зуга, С.Г.Калиниченко, В.А.Невзорова, И.В.Архипенко

НАДФН-ДИАФОРАЗА ЭПИТЕЛИЯ БРОНХОВ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Кафедра гистологии, кафедра пропедевтики внутренних болезней
Владивостокского медицинского университета

NADPH-DIAPHORASE OF HUMAN BRONCHIAL EPITELIUM

M.V.Zuga, S.G.Kalinichenko, V.A.Nevzorova, I.V.Arkhpenko

S u m m a r y

The expression of NADPH-diaphorase co-localized with NO-synthase in bronchial epithelium of human embryos in first and second half of gestation was studied thopochemically. The expression of NADPH-diaphorase was decreased in embryos of first half of pregnancy and was increased in embryos of second half of pregnancy in bronchi in the direction of 11 to 16 degrees. The result of increasing enzyme expression in embryos of the second half of pregnancy confirms the lung readiness to functioning.

Р е з ю м е

Исследована топохимия и активность НАДФН-диафоразы, солокализованной с NO-синтазой в эпителии бронхов плодов человека первой и второй половин беременности. Наличие энзима установлено в бронхиолах 11, 13 и 16 порядков деления. Показано, что активность НАДФН-диафоразы в направлении от бронхиол 11 порядка к бронхиолам 16 порядка снижена у плодов первой половины и повышена у плодов второй половины беременности. Последнее свидетельствует о готовности легких к функционированию.

Воздухопроводимость кондукторного отдела легких находится в зависимости от структурно-функциональной целостности его эпителиальной выстилки [9]. Воздух является естественным раздражителем эпителиоцитов, которые через внутренний релаксирующий фактор снижают при вдохе тонус гладких миоцитов бронхов [2,13]. Считается, что, как и кровеносные сосуды, бронхи релаксирует окись азота — NO [7].

Изучение NO-синтазы и сопряженной с ней НАДФН-диафоразы — ферментов, синтезирующих NO, показало их высокую активность в мелких бронхах животных [10,11]. Относительно человека подобных исследований в литературе мы не нашли, хотя имеются данные о NO-синтазе в эпителии бронхов, полученные при исследовании материала, взятого при операции на легких [12].

Цель нашей работы состояла в цитохимической идентификации и количественной оценке НАДФН-диафоразы в развивающихся легких.

Исследовали фермент в легких абортированных плодов первой (18—20 нед) и второй (34—37 нед) половины беременности. НАДФН-диафору выявляли по прописи, приведенной в работе Hope, Vicent [8]. Участки легких размером 1×0,5 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°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-HCl-буфер (pH 8,0), 1 мМ НАДФН ("Sigma"), 0,5 мМ нитросинего тетразола (НСТ) ("Sigma") и 0,2% тритон X-100 ("Serva"). Инкубацию проводили в течение 60 мин при 37°C.

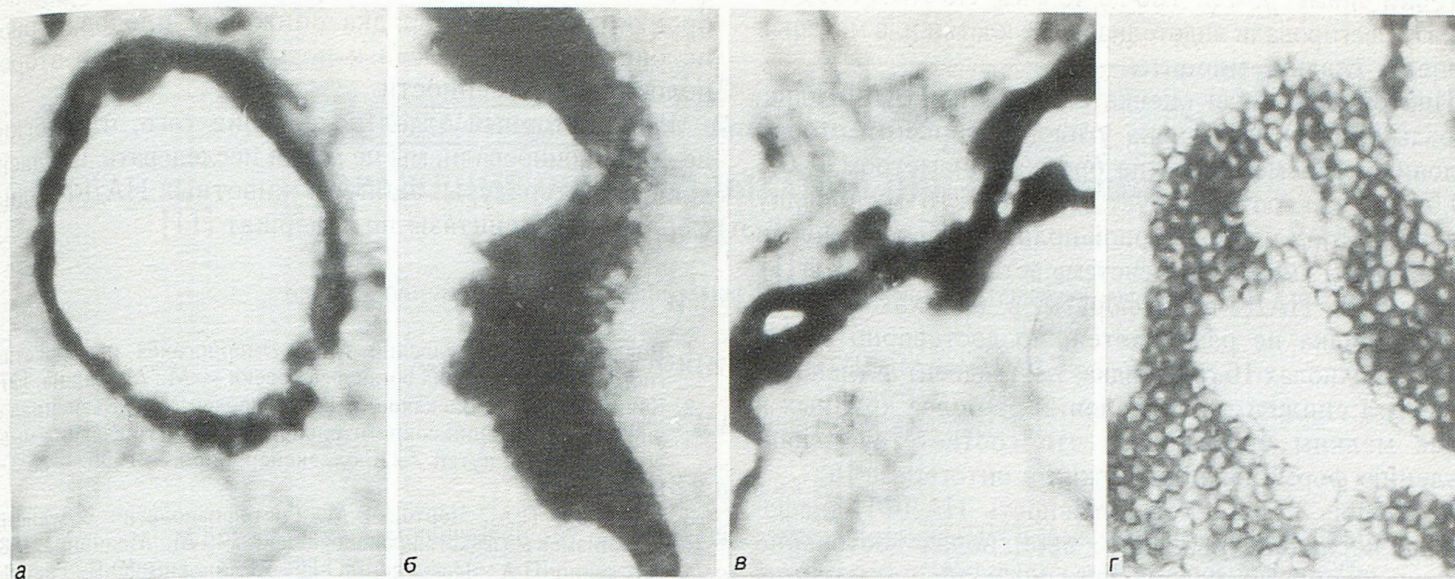


Рис.1. Топография НАДФН-диафоразы в бронхиолах плодов человека.

а — бронхиолы 0,8 мм. Ув. $\times 200$, б — фрагмент бронхиолы 1 мм. Ув. $\times 400$, в — претерминальные и терминальные бронхиолы. Ув. $\times 200$. Энзим локализован в эпителиоцитах, соединительная и мышечная ткань стенки бронхиолы фермента не содержат, г- касательный срез через эпителиальный пласт бронха. НАДФН-диафораза локализована по периферии клеток. Ув. $\times 400$.

после чего срезы ополаскивали в дистилляте, обезжировали и заключали в бальзам по общепринятой методике. В качестве контроля в инкубационную среду вводили 1 мМ нитро-L-аргинина, селективного 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. Диаметр бронхов измеряли с помощью МОВ-1-15 на микроскопе фирмы "Carl Zeiss Jena".

Под влиянием НАДФ-диафоразы эпителиоцитов НСТ трансформируется в диформаза голубого или синего цвета. Интенсивность окраски и плотность преципитата свидетельствуют об уровне активности не только диафоразы, но и NO-синтазы. По общепринятому мнению, NO-синтаза, образующая NO, обладает мощной диафоразной активностью и по своим биофизическим характеристикам идентична НАДФН-диафоре. Оба фермента локализованы в одних и тех же клеточных структурах; их активность изменяется прямо пропорционально и взаимозависимо [14]. Поэтому НАДФН-диафораза является специфическим маркером клеток, синтезирующих NO.

В легких плодов человека на НАДФН-диафорузу селективно окрашивался эпителий мелких бронхов (рис.1). На фоне светлой легочной ткани он имел вид ярко-синего кольца, контурирующего бронх со стороны просвета. Реснички с НСТ не реагировали, но наличие у них связи с синими телами призматических клеток позволило заключить, что НАДФН-диафораза локализована в ресничном эпителии.

Положение фермента в клетке было уточнено при исследовании касательных срезов через эпителиальный пласт. На таких препаратах было видно, что

диформаза окрашивал узкую периферическую кайму эпителиоцита. Центральная часть цитоплазмы и клеточное ядро с НСТ не реагировали и фермента, следовательно, не содержали. Вероятно, НАДФН-диафораза эпителиоцита бронхов — это в основном фермент плазматической мембраны. Окончательно этот вопрос могут решить электронно-микроскопические исследования.

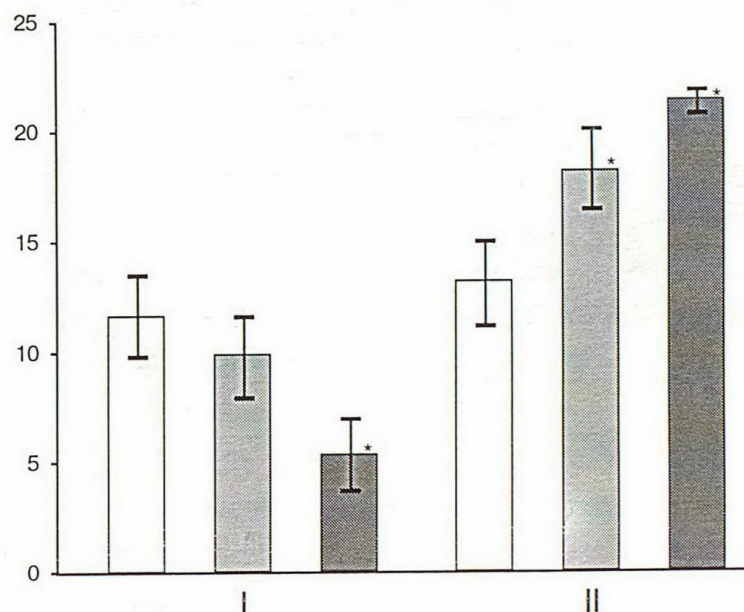


Рис.2. Активность НАДФН-диафоразы в эпителии бронхов.

I и II — соответственно первая и вторая половина беременности. На оси ординат: оптическая плотность преципитата. Светлые столбцы — бронхиола диаметром 1 мм (11-й порядок деления); серые — бронхиола диаметром 0,8 мм (13-й порядок деления); темные — бронхиола диаметром 0,5 мм (16 порядок деления).

* — разница достоверна в I и II группе и между бронхами соответствующего диаметра ($p < 0.05$).

Кроме эпителия, ярко окрашивались бронхиальные артерии диаметром от 160 до 40 мкм. На НАДФН-диафору реагировали эндотелиальные клетки и, в меньшей степени, гладкие миоциты.

Инструментальная оценка активности НАДФН-диафоразы (рис.2) выполнена у плодов первой и второй половины беременности на бронхах диаметром 1, 0,8 и 0,5 мкм, что соответствует их 11, 13 и 16-му порядку деления [15]. У плодов первой половины беременности (18—20 нед) имеется вся система ветвления бронхов [1]. Активность НАДФН-диафоразы в бронхах 11-го и 13-го порядка не различается, но достоверно выше, чем в бронхиолах 16-го порядка, т.е. градиент активности фермента снижен в направлении от более крупных к более мелким бронхиолам, что соответствует направлению формирования легких в онтогенезе [5].

У плодов 35—37 нед активность НАДФН-диафоразы в исследованных нами бронхиолах достоверно различается: наименьшая активность фермента установлена в бронхиолах диаметром в 1 мм, примерно равная активности фермента соответствующего по калибру бронхиолам плодов первой половины беременности. Образование диформазана заметно увеличивается в бронхиолах 13 и 16-го порядка деления, что свидетельствует о возрастающей активности НАДФН-диафоразы. Градиент ее активности повышается от бронхиол 11-го к бронхиолам 16-го порядка. Это свидетельствует в общих чертах о законченности развития основных структур легких и их готовности к функционированию [5]. Видимо, претерминальные и терминальные бронхиолы легких человека не являются исключением из правила; как и у животных [11], они обладают наивысшей активностью НАДФН-диафоразы. Солокализированная с диафоразой NO-синтаза, образуя NO, контролирует проходимость этих бронхиол [6], определяющих наполняемость воздухом респираторных отделов.

Остается открытым вопрос о путях передачи NO из эпителиоцитов на гладкую мышечную клетку бронхиолы. В кровеносных сосудах транспорт NO происходит с помощью миоэндотелиальных контактов и через цГМФ и специфические протеинкиназы релаксирует гладкую мышцу [3,4]. В мелких бронхах ту же роль, вероятно, могли бы выполнить миоэпителиальные контакты, наличие которых ввиду тесного сближения эпителиального пласта и мышечного слоя вполне возможно.

Таким образом, градиент активности НАДФН-диафоразы в направлении от бронхиол 11-го порядка к бронхиолам 16-го порядка снижен у плодов первой половины беременности и повышен у плодов второй половины беременности.

Респираторный отдел вследствие того, что легкие не функционировали, мы не могли исследовать. Согласно данным литературы, ацинусы животных НАДФН-диафоразы и NO-синтазы не содержат [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова О.В., Пекарский М.И. Эмбриогенез и возрастная гистология внутренних органов человека. — М.: Медицина, 1976.
2. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. Зависимость от эпителия регуляция сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей // Бюл. exper. биол. — 1995. — № 3. — С.283—285.
3. Мотавкин П.А., Черток В.М. Гистофизиология сосудистых механизмов мозгового кровообращения. — М.: Медицина, 1980.
4. Мотавкин П.А., Пиголкин Ю.И., Каминский Ю.В. Гистофизиология кровообращения в спинном мозге. — М.: Наука, 1994.
5. Пэттен Б.М. Эмбриология человека. — М.: Медгиз, 1959.
6. Barnes P.J. Airway epithelial receptors // Eur. Respir. Rev. — 1994. — Vol.4, № 24. — P.371—379.
7. Barnes P.J. Nitric oxide and airway disease // Ann. Med. — 1995. — Vol.27, № 3. — P.389—399.
8. Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterisation of neuronal NADPH-diaphorase // J. Histochem. Cytochem. — 1989. — Vol.37. — P.653—661.
9. Laitinen L.A., Laitinen A. Structural and cellular changes in asthmas // Eur. Respir. Rev. — 1994. — Vol.4, № 23. — P.348—351.
10. Robbins R.A., Hamel F.G., Floreani A.A. Bovine bronchial epithelial cells metabolise L-arginine L-citrulline: possible role of nitric oxide synthase // Life Sci. — 1993. — Vol.52. — P.709—716.
11. Schmidt H., Gagne G., Nakane M. Mapping of Neuronal Nitric oxide synthase in the rat suggest frequent co-localisation with NADPH-diaphorase but not with soluble Guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for Nitricergic signal transduction // J. Histochem. Cytochem. — 1992. — Vol.40, № 10. — P.1439—1456.
12. Springall D.R., Meng Q.-H., Butterg L.D. Human airway epithelium expresses inducible nitric oxide synthase in emphysema // J. Pathol. — 1995. — Vol.175, Suppl. — P.105.
13. Thompson A.B., Robbins R.A., Romberger D.J. Immunological function of pulmonary epithelium // Eur. Respir. J. — 1995. — № 8. — P.127—149.
14. Vincent S.R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system // Prog. Neurobiol. — 1994. — Vol.42. — P.129—160.
15. 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.