

Е.Л.Казачков, В.Л.Коваленко

СОДЕРЖАНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ БРОНХОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ БРОНХИТЕ (ЛЕКТИНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Челябинский медицинский институт

THE GLYCOPROTEINS CONTENT AND THEIR DISTRIBUTION IN BRONCHIAL EPITHELIOCYTES DURING CHRONIC BRONCHITIS. THE LECTINOHISTOCHEMICAL STUDY

Y.L.Kazachkov, V.L.Kovalenko

S u m m a r y

The luminescence examination of bronchial biopsy specimens taken from 52 patients with primary chronic bronchitis and 8 healthy volunteers (control group) was carried out using lectin sets marked with FITC having the various carbohydrate specificity. Selective lectin markers from healthy bronchial wall epithelial cells were determined. It was shown that defense properties of the normal bronchial mucus membrane are associated with glycoconjugates of goblet cells because mucus glands do not contain sialomucins. During chronic bronchitis, redistribution of lectin receptors is manifested by the increased level of binding with bronchial mucus formation apparatus cells of lectin which is akin to fucomucin and by the decrease of the content of receptors to lectin reacting with sialic acids (the decreased level of sialomucins). During basement hyperplasia and squamous metaplasia of germinal epithelium, the cellular differentiation impairment is accompanied with intensive binding of concavalin-A that isn't normal characteristics of basal epithelial cells. That may prove significantly when immunoglobulin secretory component synthesis is impaired and local immune pathological reactions are formed. The revealed disturbances of production and those of the glycoproteins content in the epithelial structure of the bronchial wall during chronic bronchitis enable to include mucoregulators into complex pathogenic therapy of that condition.

Р е з ю м е

Оценка люминесценции образцов бронхиальной биопсии, взятой от 52 больных с первичным хроническим бронхитом и от 8 здоровых добровольцев (контрольная группа), проводилась с использованием лектиновых ячеек, маркированных FITC, имеющим различную углеводную специфичность. Определялись селективные лектиновые маркеры эпителиальных клеток здоровой бронхиальной стенки. Было показано, что защитные свойства нормальной бронхиальной слизистой связаны с гликоконъюгатами бокаловидных клеток, поскольку слизистые железы не содержат сиаломуцинов. При хроническом бронхите перераспределение лектиновых рецепторов проявляется через увеличение степени связывания клеток аппарата продукции слизи с лектином, который родственен фукомучину, и через снижение лектиновых рецепторов, реагирующих с сиаловыми кислотами (сниженный уровень сиаломуцина). При базальной гиперплазии и сквамозной метаплазии продуктивного эпителия нарушение клеточной дифференцировки сопровождается интенсивным связыванием с конкавалином-А, что является ненормальной характеристикой базальных эпителиальных клеток. Это может быть вполне достоверно, когда секреция компонентов иммуноглобулина нарушена, и формируются локальные патологические иммунные реакции. Выявленные нарушения продукции и содержания гликопротеинов в эпителиальной структуре бронхиальной стенки при хроническом бронхите способны включать мукорегуляторы в комплекс патогенетической терапии при этих условиях.

Протективные свойства слизистой оболочки бронхов во многом определяются составом бронхиальной слизи [5,18]. Это важнейший компонент мукоцилиарной системы, который служит первым барьером на пути экзогенных факторов повреждения [12—14]. Защитные свойства бронхиального секрета обусловлены наличием в нем секреторных гликопротеинов — белков, содержащих концевые олиго- и моносахаридные цепи [1,12]. Традиционные методы

гистохимии углеводов и углеводсодержащих биополимеров [2,3,10,11] при значительном разнообразии получаемой с их помощью информации не лишены ряда существенных недостатков. Главные из них — сравнительно низкая чувствительность (в частности, для положительного результата ШИК-реакции содержание углеводного компонента должно составлять 0,5—1% сухой массы ткани), недостаточная селективность к отдельным классам гликополимеров,

неприемлемость ряда классических методов гистохимии углеводов для прижизненного изучения тканевых материалов. В последние годы показана перспективность применения лектиногистохимических методов при анализе патологических процессов, сопровождающихся накоплением, перераспределением или извращением синтеза гликоконъюгатов в тканях [4,6,15,19]. С этой целью предложено использовать наборы лектинов различной углеводной специфичности, которые позволяют проводить избирательную идентификацию гликопротеинов [7,8,16]. Насыщенность структур бронхиальной стенки углеводсодержащими биополимерами, а также отсутствие работ по сравнительному гистохимическому и лектиногистохимическому изучению слизиобразующего аппарата бронхов у здоровых лиц и больных первичным хроническим бронхитом (ХБ) послужили основанием для выполнения этого исследования.

Объектом изучения являлись биоптаты из шпоры среднедолевого бронха, полученные при бронхоскопии (врач-эндоскопист Е.Р.Олевская) у 52 больных мужского пола в возрасте 16—45 лет, страдавших первичным ХБ. Кроме того, в группу контроля выделены биоптаты бронхов 8 пациентов, у которых при комплексном клиническом исследовании были исключены заболевания бронхолегочного аппарата. Кусочки ткани фиксировали 24 часа в 40-нейтральном формалине и заключали в парафин. Срезы помещали на каплю дистиллированной воды на предметное стекло

и высушивали при температуре 42°C в течение 48 часов. После депарафинирования и проведения через спирты нисходящей концентрации они тщательно промывались в забуференном изотоническом растворе хлорида натрия при pH=7,4, затем обрабатывались 0,001% растворами конъюгатов лектинов и инкубировались в течение 12 часов при температуре 4°C. Микропрепараты изучали с помощью микроскопа "ЛЮМАМ-Р8" со светофильтром возбуждения ФС-3 и запирающим светофильтром ЖС-18. Для визуализации углеводных детерминант гликопротеинов в бронхобиоптатах применен набор лектинов различной специфичности, меченных ФИТЦ, изготовленный НПК "Лектинотест" (г. Львов). Для обработки срезов были использованы лектин завязей пшеницы (WGA, специфичный к N-ацетил-D-глюкозамину), конканавалин А (ССА, специфичный к α-D-маннозе), лектин сои (SBA, специфичный к N-ацетил-D-галактозамину), лектин клещевины (RCA, специфичный к α-D-галактозе), лектин бузины черной (SNA, специфичный к N-ацетилнейраминаовой кислоте) и лектин бобовника анагирилистного (LAA, специфичный к α-L-фукозе). Общую морфологию бронхобиоптатов исследовали после окраски гистологических срезов гематоксилином и эозином, коллагеновые волокна идентифицировали по методу Ван-Гизона, эластические структуры — с помощью реакции Вейгерта, нейтральные мукополисахариды — Шик-реакции, гликозаминогликаны — альциановым синим с ферментативными контро-

Т а б л и ц а

Интенсивность связывания лектинов рецепторами эпителиоцитов бронхиальной стенки в норме (n = 8) и при хроническом бронхите (n = 52)

Углеводная специфичность	CCA	WGA	SBA	RCA	SNA	LAA
	α-D-манноза	N-ацетил-D-глюкозамин	N-ацетил-D-галактозамин	α-D-галактоза	N-ацетилнейраминаовая (сиаловая) кислота	α-L-фукоза
Реснитчатые эпителиоциты	+++ / 100*	++ / 75*	0	++ / 38*	++ / 25*	++ / 38*
	+++ / 94	+ / 81	0	+ / 48	+ / 77	++ / 94
Бокаловидные эпителиоциты	0	+++ / 63*	++ / 75	+++ / 50*	+++ / 75*	++ / 25*
	0	+ / 78	+ / 75	++ / 77	0	+++ / 96
Базальные эпителиоциты	0*	+++ / 100*	0*	+ / 38*	0	+ / 25*
	+++ / 87	+ / 83	++ / 67	+++ / 94	0	+++ / 100
Слизистые glandулоциты	0	0	++ / 63*	++ / 50*	0	+++ / 63*
	0	0	++ / 96	+ / 73	0	+++ / 81
Серозные glandулоциты	++ / 100*	++ / 100*	+ / 13*	+ / 75	+++ / 38*	+++ / 63*
	++ / 92	0	++ / 58	+ / 75	+ / 67	++ / 77
Базальноклеточная гиперплазия эпителия (n=19)	+++ / 100	+ / 48	+ / 48	++ / 77	0	++ / 81
Плоскоклеточная метаплазия эпителия (n=3)	+++ / 96	+ / 33	++ / 48	++ / 73	+ / 29	++ / 81

П р и м е ч а н и е. +++ — выраженная интенсивность свечения, ++ — умеренная интенсивность свечения, + — слабая интенсивность свечения (следы лектина), 0 — свечение отсутствует; в числителе — результаты исследования неизменной бронхиальной стенки, в знаменателе — при ХБ; арабские цифры — процент положительных результатов при использовании определенных лектинов. Звездочка — различия достоверны по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

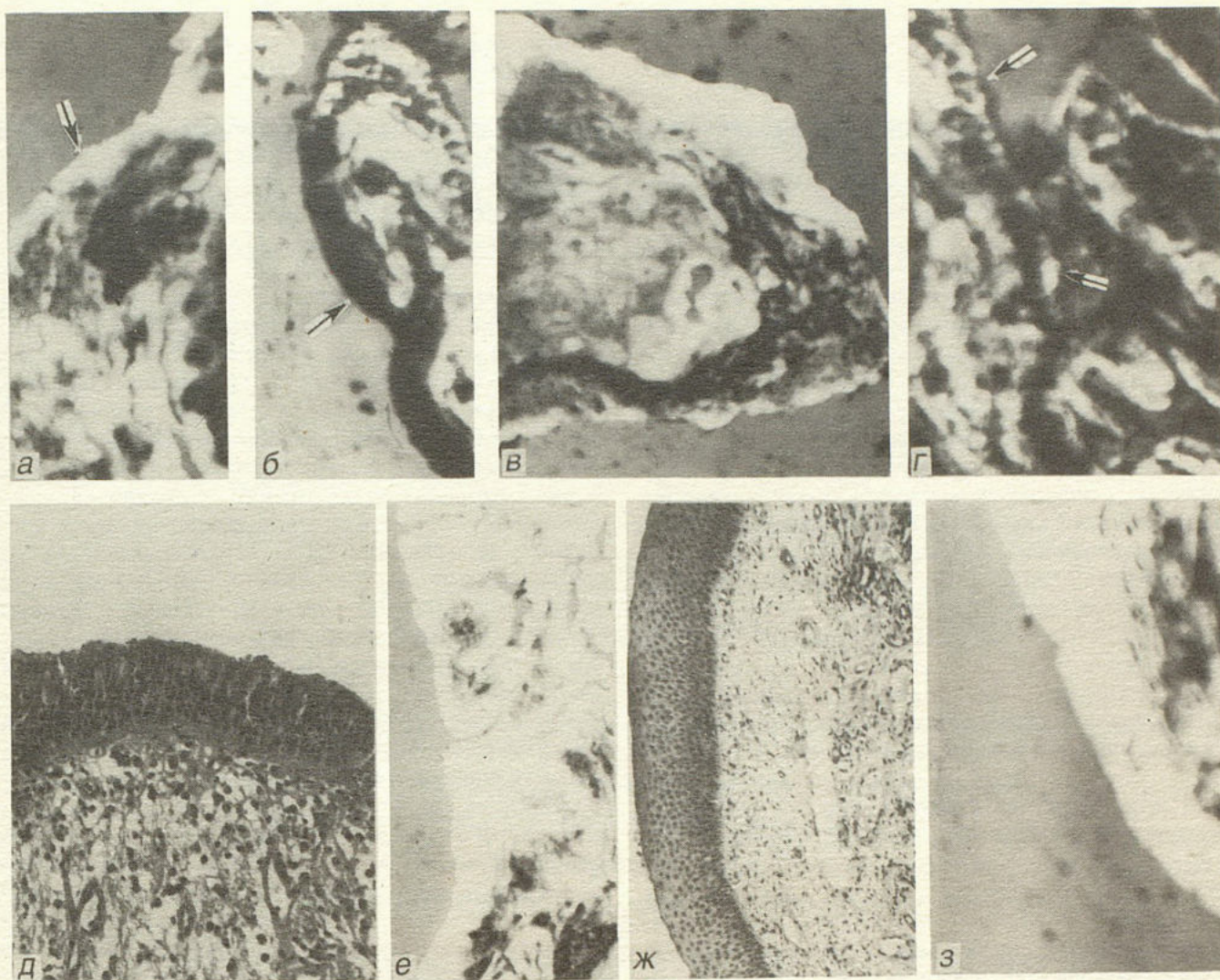


Рис. Сравнительная морфологическая характеристика эпителиоцитов бронхов при хроническом бронхите.

а — диффузное распределение сиаловой кислоты в покровном эпителии неизменной бронхальной стенки, реакция с SNA (указано стрелкой); б — отсутствие связывания SNA покровными эпителиоцитами при ХБ (указано стрелкой); в — высокое сродство элементов покровного эпителия и слизистых glandулоцитов к LAA при ХБ; г — свечение рецепторов к LAA при ХБ в супрануклеарной зоне бокаловидных клеток (указано стрелками); д — базальноклеточная гиперплазия покровного эпителия; е — диффузная реакция связывания CCA (выявление α -D-маннозы) пролиферирующими базальными эпителиоцитами; ж — плоскоклеточная метаплазия бронхального эпителия; з — сродство элементов многослойного плоского эпителия к RCA (выявление α -D-галактозы). а, б, г, е, з: $\times 140$; в, д, ж: $\times 200$. д, ж — окраска гематоксилином и эозином; а—г, е, з — прямая реакция лектинофлюоресценции.

лями. Выявленные изменения анализировали с учетом классификации поражений бронхов, предложенной Г.А.Непомнящих [9]. Оценка результатов лектиногистохимического исследования осуществлялась полуколичественным методом при сравнении с контролем, при этом в основу статистической обработки взят закон нормального распределения вариант при минимальном уровне достоверности 95%.

Исследование бронхобиоптатов группы контроля позволило установить селективные лектиновые маркеры эпителия неизменной бронхальной стенки (таблица). Высокое сродство к терминальным углеводным детерминантам гликопротеинов бокаловидных эпителиоцитов проявляли WGA, SBA, RCA, SNA и LAA. Причем более выраженная селективность отмечена у SBA и SNA (рис., а). Слизистые glandулоциты желез подслизистого слоя избирательно реагировали

лишь с SBA, RCA и LAA. Высокое содержание рецепторов к абсолютному большинству использованных лектинов зарегистрировано в реснитчатых и бокаловидных клетках покровного эпителия, а также в серозных железах с преимущественной локализацией меченых гликоконъюгатов в базальных мембранах glandулоцитов. Слизь продуцирующие и слизьсодержащие элементы бронхальной стенки практически были лишены рецепторов к CCA, то есть не содержали маннозу. Последняя идентифицирована в реснитчатых клетках и серозных glandулоцитах желез. Следовательно, процесс сборки углеводной цепи гликопротеинов в клетках слизиобразующего аппарата бронхов характеризовался последовательным включением моносахаров в олигосахаридную цепь, начинающуюся галактозой и кончающуюся сиаловыми кислотами или фукозой. Любопытен тот факт, что

гликопротеины бокаловидных клеток покровного эпителия и слизистых glanduloцитов желез имели различные качественные и количественные характеристики. Так, в слизи бокаловидных эпителиоцитов выявлялись рецепторы ко всем (кроме CCA) использованным лектинам с преобладанием представительства WGA и RCA. Слизь железистых ацинусов не связывала WGA и SNA. В связи с этим полагаем, что наибольшим протективным действием обладают гликоконъюгаты покровного эпителия, поскольку в железах подслизистого слоя неизменной бронхиальной стенки не выявлены сиаловые кислоты.

При изучении общей патоморфологии бронхобиоптатов больных ХБ в 39 наблюдениях диагностирована катаральная, в 9 — катарально-склерозирующая, в 4 — склерозирующая форма заболевания. При этом в 19 случаях в покровном эпителии бронхов зарегистрированы очаги базальноклеточной гиперплазии, а в 3 — плоскоклеточной метаплазии. Анализ лектиногистохимических реакций показал, что при ХБ возникает перераспределение рецепторов к лектинам, указывающее на глубокие структурные изменения в углеводной цепочке гликопротеинов (см. таблицу). Так, отмечено значительное ослабление связывания WGA и SNA рецепторами всех без исключения эпителиальных клеток бронхиальной стенки, особенно слизиобразующих, что указывает на обеднение местных гликопротеинов N-ацетилнейраминавой и сиаловыми кислотами (рис., б). Наряду с этим, достоверно нарастала интенсивность реакции связывания LAA (рис., в). Наибольшая интенсивность свечения люминисцирующего материала отмечена в супрануклеарной зоне бокаловидных и цитоплазме базальных клеток покровного эпителия (рис., г), а также в слизистых glanduloцитах желез, что, вероятно, следует связать с повышением содержания в этих эпителиоцитах гликоконъюгатов, богатых терминальной фукозой. Необходимо отметить, что выявленные особенности слизиобразования были в большей степени выражены при катаральной форме ХБ.

В наблюдениях ХБ с базальноклеточной гиперплазией покровного эпителия в цитоплазме пролиферирующих базальных клеток отмечено диффузное связывание CCA и LAA с высокой или умеренной интенсивностью свечения (рис., д, е), в то время как при ХБ без базальноклеточной гиперплазии и в неизменной бронхиальной стенке базальные эпителиоциты не имели рецепторов к CCA. В контрольной группе базальные клетки, имеющие сродство к фукозе, встречались в четыре раза реже, чем при ХБ с базальноклеточной пролиферацией эпителия.

При плоскоклеточной метаплазии эпителия элементы многослойного покровного пласта связывали CCA, SBA, RCA и LAA (рис., ж, з). Слизь продуцирующие и слизьсодержащие glanduloциты подслизистого слоя очень слабо реагировали с WGA и не имели рецепторов к SNA, что свидетельствовало о резком обеднении этих структур сиаломуцинами.

Таким образом, проведенным исследованием установлено неравномерное распределение рецепторов к лектинам в структурах неизменной бронхиальной стенки.

Селективными маркерами реснитчатых эпителиоцитов следует считать CCA и WGA, бокаловидных клеток — SBA и SNA, базальных — WGA, слизистых glanduloцитов желез подслизистого слоя — LAA и SBA, серозных клеток желез — CCA, WGA и RCA. Протективные свойства бронхиальной слизи в норме связаны, главным образом, с гликоконъюгатами бокаловидных клеток, так как слизистые железы не содержат сиаломуцинов. При первичном ХБ выявлено перераспределение рецепторов лектинов. Это проявилось прежде всего в повышении уровня связывания клетками слизиобразующего аппарата бронхов лектинов, имеющих сродство к фукомуцинам, и снижением содержания рецепторов к лектинам, селективно реагирующим с сиаловыми кислотами (падение уровня сиаломуцинов). При базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии покровного эпителия нарушение клеточной дифференцировки сопровождается интенсивным связыванием CCA, что в норме базальным эпителиоцитам не свойственно. Зарегистрированные изменения защитных свойств слизевого покрытия бронхов, наиболее выраженные при катаральной форме ХБ и плоскоклеточной метаплазии эпителия, могут иметь значение в нарушении синтеза секреторного компонента иммуноглобулина А и формировании местных иммунопатологических реакций. Это может способствовать персистенции микроорганизмов в структурах бронхиальной стенки, обуславливать развитие и выраженность воспалительных и дистрофических процессов в слизистой оболочке бронхов. Выявленные расстройства продукции и содержания гликопротеинов в эпителиальных структурах бронхиальной стенки при ХБ позволяют обоснованно рекомендовать включать в комплексную патогенетическую терапию этого страдания препараты-мукорегуляторы — N-ацетилцистеин, карбцистеин, амброксол и др. [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия человека / Марри Р., Греннер Д., Мейес П. и др.: Пер. с англ. — М., 1993. — Т.2. — С.299—318.
2. Биров В.В. Гистохимическое изучение кислых мукосубстанций альциановой группой красителей // Арх. пат. — 1970. — № 6. — С.75—76.
3. Виноградов В.В. Углеводные соединения // Принципы и методы гистохимического анализа в патологии / Под ред. А.П.Авцына, А.И.Струкова, Б.Б.Фукса. — Л., 1971. — С.7—87.
4. Зербино Д.Д., Луцик А.Д., Котык А.Е. и др. Расслаивающая аневризма аорты: гистохимическое исследование с применением набора лектинов различной углеводной специфичности // Арх. пат. — 1987. — № 3. — С.20—25.
5. Каминская Г.О. Современные представления о биохимии бронхиального секрета в норме и при заболеваниях бронхолегочной системы // Пробл. туб. — 1985. — № 5. — С.63—71.
6. Луцик А.Д., Яценко А.М., Детюк Е.С. и др. Рецепторы лектинов в слюнных железах крыс в процессе постнатального развития // Арх. анат. — 1986. — № 8. — С.27—35.
7. Луцик А.Д., Зербино Д.Д. Применение лектинов в патоморфологии: итоги и перспективы // Арх. пат. — 1988. — № 3. — С.77—81.
8. Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектины в гистохимии. — Львов, 1989.
9. Непомнящих Г.И. Прижизненная морфология крупных бронхов человека при хронических воспалительных заболеваниях легких. — Новосибирск, 1977.

10. Ованесбекова Т.Г. Гистоэнзиматический и гистохимический анализ неклоточных структур рыхлой соединительной ткани человека в онтогенезе // Арх. пат.— 1971.— № 8.— С.42—45.
11. Пирс Э. Гистохимия: Пер. с англ.— М., 1962.
12. Солопов В.Н. Развитие представлений о системе мукоцилиарного транспорта // Тер. арх.— 1989.— № 3.— С.58—62.
13. Страшина О.А. Значение исследования биохимических свойств мокроты у больных бронхогенным раком и неспецифическими заболеваниями легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Л., 1983.
14. Clamp J.R. The relationship between the immune system and mucus in the protection of mucous membranes // Biochem. Soc. Trans.— 1984.— Vol.12.— P.754—756.
15. Franz H. Advances in Lectin Research.— Berlin, 1988.
16. Lopata N., Barton A., Lourenco R. Biochemical characteristics of bronchial secretions in chronic obstructive pulmonary disease // Am. Rev. Respir. Dis.— 1974.— Vol.110.— P.730—739.
17. Polu J.M., Delorme N. Anomalies du mucus et pathologie bronchique de l'adulte // Rev. Mal. Respir.— 1989.— № 6.— P.493—499.
18. Rieger C.H., Riedel F. Lokale Abwehrmechanismen der Lunge // Atemw. Lungenkr.— 1985.— Bd 11, № 4.— S.141—144.
19. Sharon N., Lis H. Lectins.— New York, 1989.

Поступила 20.01.94.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.24-002.3-07:616.61-072.7

М.М.Кириллов, М.М.Шашина

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК У БОЛЬНЫХ ГНОЙНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

Кафедра внутренних болезней стоматологического факультета Саратовского медицинского университета

THE FUNCTIONAL STATE OF KIDNEYS IN PATIENTS WITH SUPPURATIVE PULMONARY DISEASE

M.M.Kirillov, M.M.Shashina

Summary

104 patients with suppurative pulmonary diseases (SPD) were examined to study the functional state of kidneys for correction of traditional therapy. 32 healthy subjects were as a control group. Glomerular filtration was evaluated with the endogenous creatinine clearance; clearances of concentration, osmotic active substances, and osmotic free water were calculated. Central hemodynamics was evaluated. Gammascintigraphy was carried out to estimate renal microcirculation.

Acute SPD (ASPD) were presented by pulmonary abscess, abscessed pneumonia, pleural empyema and staphylococcal pulmonary destruction. Chronic ones (CSPD) were presented by bronchiectasia and chronic purulent bronchitis. During ASPD, the increase of renal excretion of titrated acids and total excretion of hydroions were revealed; during CSPD, these changes were more moderate. The scintigraphic data showed the significant impairment of renal microcirculation.

The results of the study showed that in patients with severe SPD the revealed impairments directed to the tubulointerstitial nephropathy formation. Dystrophy of tubular epithelium, focal sclerosis and lymphohistiocytic infiltration of interstitium were found. Use of intravascular laser radiation in complex with traditional therapy promoted the normalization of osmotic homeostasis and the increase of the clearance of middle molecular size peptides.

Резюме

104 пациента с гнойными заболеваниями легких (ГЗЛ) обследовались с целью изучения функционального состояния почек для коррекции общепринятой терапии. 32 здоровых добровольца составили контрольную группу. Изучалась клубочковая фильтрация по клиренсу эндогенного креатинина, рассчитывался концентрационный клиренс, клиренс осмотически активных веществ и осмотически свободной воды. Оценивалась центральная гемодинамика и почечное кровообращение свободной воды. Среди острых гнойных заболеваний легких (ОГЗЛ) выделялись абсцесс и абсцедирующая пневмония, эмпиема плевры, стафилококковая деструкция, среди хронических (ХГЗЛ): бронхоэктатическая болезнь и гнойный бронхит. При ОГЗЛ выявлено увеличение почечной экскреции титруемых кислот, тотальная экскреция водородных ионов, при ХГЗЛ эти изменения были умеренно увеличены. Данные скintiграфии указывали на значительное нарушение почечного кровообращения.

Результаты исследования показали, что у тяжелых больных ГЗЛ характер выявленных нарушений указывает на развитие тубулоинтерстициальной нефропатии. Обнаружены дистрофия канальцевого