

УДК 612-018.7:616.231]616.248

DOI: 10.12737/23249

ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕСНИЧАТОГО ЭПИТЕЛИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**М.Т.Луценко***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22***РЕЗЮМЕ**

При бронхиальной астме в слизистой оболочке бронхиальных путей вследствие хронического воспалительного процесса нарушается работа мукоцилиарной системы и происходит перестройка эпителиального слоя слизистой оболочки, а число мерцательных клеток при тяжелой форме бронхиальной астмы уменьшается вплоть до 70%. Причиной перестройки мерцательного эпителия является накопление в слизистой оболочке большого количества перекисей жирных кислот, под влиянием которых снижается активность сукцинатдегидрогеназы и АТФ в базальных тельцах ресниччатых клеток. При тяжелой форме бронхиальной астмы происходит подавление активности мукоцилиарного клиренса вследствие гибели большого количества ресниччатых клеток слизистой оболочки бронхиальных путей.

Ключевые слова: бронхиальная астма, мукоцилиарный клиренс.

SUMMARY**MOTION ACTIVITY OF AIRWAY CILIATED EPITHELIUM IN PATIENTS WITH ASTHMA****M.T.Lutsenko***Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

At asthma in bronchial mucous tunic as a result of chronic inflammatory process the working of mucociliary system is disturbed and there is restructuring of epithelial layer. The number of ciliary cells at the severe form of asthma decreases till 70%. The reason of restructuring of ciliated epithelium is the accumulation of a big number of fatty acids peroxides in the mucous tunic. Under their influence there is a decrease of activity of succinate dehydrogenase and ATP in the basal bodies of ciliary cells. Under the severe form of asthma there is a suppression of activity of mucociliary clearance as a result of destruction of a big number of bronchial mucosa ciliated cells.

Key words: bronchial asthma, mucociliary clearance.

Механизм мерцательного движения ресничек заложен в самих ресничках. Однако автоматическая деятельность регулируется механизмами, которые остаются в значительной степени невыясненными [8].

Реснички мерцательных клеток содержат 9 пар периферических и одну пару центральных продольных

трубчатых фибрилл, связанных поперечными связями в единую систему – аксонему [7, 9]. Стенки трубчатых фибрилл содержат 12-15 протофибрилл. Движение ресничек связано с работой периферических фибрилл, так как именно в них происходит АТФ-азная активность. В составе фибрилл ресничек имеются сократительные белки, обладающие АТФ-азной активностью.

Одним из ведущих белков, принимающих участие в сократительной функции, является актин, с которым связан нуклеотид и двухвалентный катион (кальций или магний) [16]. Актин связывается более прочно с АТФ, чем с АДФ, и концентрация Mg^{++} в цитозоле значительно превышает содержание кальция.

Механизмы двигательной активности ресничек определяются полимеризацией мономерного актина. Полимеризация актина представляет обратимый характер, при котором мономеры постоянно добавляются к концу филамента и отщепляются от него.

Критическая концентрация представляет постоянную величину и зависит от регуляторных белков, связанных с активными мономерами. Элонгация мономеров контролируется белками нуклеации [12, 15].

Активные субъединицы, обладающие ферментативной активностью, после включения в филамент АТФ гидролизуют его. Мономерный актин этого выполнить не может и осуществляет данный процесс только в процессе полимеризации.

АТФ необходим для регуляции функций актина в клетке. Энергия гидролиза АТФ используется не для обеспечения сборки и разборки актина и направленного движения мономеров по филаментам [11, 13]. Средоточие АТФ и сукцинатдегидрогеназы, обеспечивающей его формирование, находится в базальных тельцах ресничек. Реснички, лишённые базальных тельц, теряют способность к двигательной активности, в то время как изолированные вместе с базальным тельцем, могут сокращаться от 2 до 4 часов. Важным элементом мерцательных эпителиев является согласованность, координированность движения ресничек в пласте клеток – метахрональные волны, что делает движения ресничек высокоэффективными. На мерцательную активность эпителия оказывают регулируемую роль такие нейромедиаторы, как ацетилхолин. Интенсивность движения ресничек зависит от температуры и концентрации водородных ионов. Как правило, форма волны является синусоидальной и распространяется в одном направлении. В трахеобронхиальных путях легких это имеет большое значение, так как наличие такого аппарата, способного осуществлять волнообразное движение, направленное в сторону

выхода из бронхиальных путей, обеспечивает очищение его от инородных частиц и скопившегося секрета при воспалительных процессах. Особенно большое внимание работе мукоцилиарного аппарата уделяется у больных с бронхиальной астмой (БА) [4-6].

Целью данной работы является раскрытие механизма работы мерцательного эпителия и описание факторов, которые оказывают повреждающее действие на мукоцилиарную систему при БА.

Материалы и методы исследования

Обследовано 20 здоровых добровольцев и 92 больных смешанной формой БА (J 45.8), в том числе 35 мужчин и 57 женщин. По критериям GINA легкое персистирующее течение астмы диагностировано у 24 больных, среднетяжелое – у 48 пациентов, тяжелое – у 20 больных. Пациенты подписывали информированное согласие на участие в клиническом исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания.

Исследование функции внешнего дыхания проводили на аппарате Ultrascreen (Erich Jaeger, Германия). Вентиляционную функцию легких оценивали по данной кривой «поток-объем» форсированного выдоха.

Забор биопсийного материала со слизистой оболочки среднедолевого бронха осуществлялся через инструментальный канал бронхоскопа при бронхоскопии. Вязкоэластические свойства секрета бронхов, взятого при помощи катетера во время брон-

хофиброскопии, определяли методом утончающейся нити [6] с измерением времени релаксации прибором Реотестер (Россия).

Для исследования двигательной активности ресничек мерцательного эпителия (МЭ) биоптат со шпору среднедолевого бронха помещали в камеру с питательной средой Хенкса, частоту колебаний ресничек МЭ изучали с помощью микроскопа, телевизионной камеры, прибора регистрации движения биологических объектов и компьютера [6].

Биопсийный материал изучался после фиксации в нейтральном 10% формалине и заливался в парафин для исследования перекисей жирных кислот. Часть материала использовалась для приготовления гистохимических срезов. Цитологические гистохимические реакции выполнялись из лаважной жидкости. Для электронно-микроскопических исследований материал фиксировался в глутаральдегиде. Перекиси жирных кислот в слизистой бронхов выявляли гистохимическим методом по Винклеру-Шульце [2]. Активность сукцинатдегидрогеназы определяли гистохимическим методом по Шелтон-Шнейдеру [1], АТФ-азу – по методу Wachstein, Meisel [3].

Результаты исследования

Проведенные исследования показали, что у больных БА отмечается снижение легочной вентиляции и нарушение бронхиальной проходимости. Особенно выражены эти изменения у больных тяжелой формой астмы (табл.).

Таблица

Показатели вентиляционной функции легких у больных БА при поступлении в клинику (M±m)

Показатели	Здоровые лица	Степень тяжести БА			P ₁	P ₂	P ₃
		легкая	средняя	тяжелая			
ОФВ ₁ , % долж.	94,20±0,25	89,90±3,7 p>0,05	62,73±4,10 p<0,001	42,89±3,10 p<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
ФЖЕЛ, % долж.	108,60±1,50	94,30±2,8 p>0,05	87,77±4,20 p<0,001	71,00±2,89 p<0,001	<0,05	<0,01	<0,01
ЖЕЛ, % долж.	112,30±1,52	96,50±3,0 p>0,05	88,00±3,58 p<0,001	77,42±3,40 p<0,001	<0,05	<0,01	<0,01
МОС ₂₅ , % долж.	92,06±4,44	70,55±2,5 p>0,05	39,90±5,73 p<0,01	14,89±2,18 p<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
МОС ₅₀ , % долж.	85,61±0,56	60,70±4,2 p>0,05	29,00±4,42 p<0,001	14,42±2,00 p<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
МОС ₇₅ , % долж.	83,72±0,61	58,45±3,1 p<0,05	32,71±4,81 p<0,001	12,94±1,94 p<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Примечание: p – достоверность различий средних значений показателей по отношению к здоровым лицам; p₁ – достоверность различий средних значений показателей между группами больных с легким течением БА и астмой средней степени тяжести; p₂ – между группами больных с легким течением БА и тяжелой формой астмы; p₃ – между группами больных БА средней степени тяжести и тяжелой формой астмы.

Длительно протекающее воспаление в слизистой бронхов при БА нарушает структуру эпителиальной выстилки слизистой оболочки. При этом наблюдается снижение содержания мерцательных клеток и изменение состава секрета бокаловидных клеток. В секрете бронхов увеличивается содержание количества хондроитин-4-сульфатов и хондроитин-6-сульфатов (рис. 1), что приводит к нарастанию вязкости секрета (рис. 2). У пациентов со средней степенью тяжести заболевания вязкоэластические свойства секрета были значительно нарушены (время релаксации нити секрета в пределах более 0,059 с) в 40% случаев, а при тяжелой форме БА – у 76,5% больных (рис. 2).

Повышенная вязкость бронхиального секрета при БА резко нарушает двигательную активность ресничек мерцательных клеток (рис. 3, 4).

Причина нарушения работы мукоцилиарной системы начинается с тяжелых изменений морфофункционального состояния реснитчатых клеток бронхиальных путей. У здоровых лиц реснитчатые клетки слизистой оболочки бронхов обладают сложным энергетическим потенциалом в виде накопления АТФ в базальном тельце (рис. 5, 6). При БА содержа-

ние АТФ в базальном тельце существенно снижается (рис. 7).

Для нормального функционирования ресничек необходима связь ее с базальным тельцем, расположенным у основания реснички (рис. 5). В теле реснички расположено 9 пар периферических и одна пара центральных трубчатых фибрилл (9×2×2), связанных поперечными связями в единую систему – аксоному. Движение ресничек связано с деятельностью периферических фибрилл, где и локализуется АТФ-азная активность (рис. 6, 7). Энергией этот процесс обеспечивается за счет цикла Кребса, поскольку в базальном тельце отмечается в норме высокая активность сукцинатдегидрогеназы (рис. 8, 10, 12).

Расщепление АТФ, то есть выполнение работы ресничек возможно только при достаточности наличия энергии, который использует в результате активной работы цикла Кребса. Мерцательные клетки в норме выявляют высокую активность сукцинатдегидрогеназы за счет чего в клетке вырабатывается достаточное количество НАДН и ФАДН₂ и в результате окислительного фосфорилирования образуется АТФ (рис. 8, 10, 12).

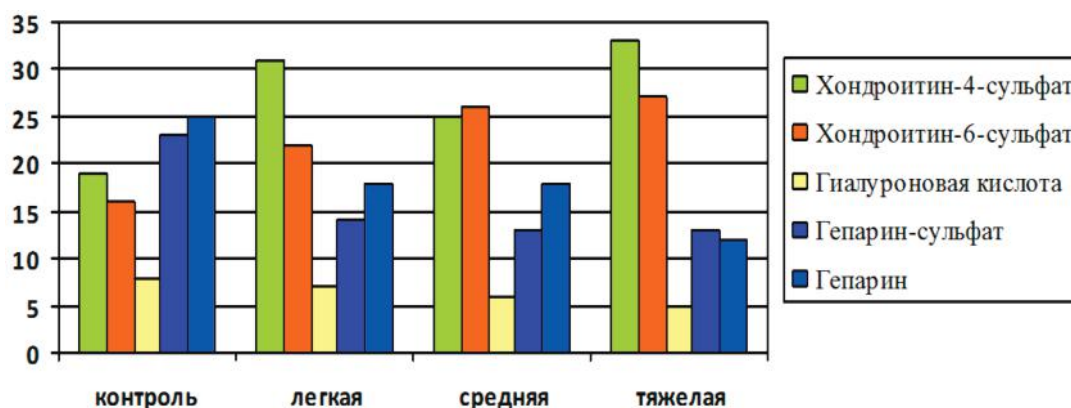


Рис. 1. Содержание гликозаминогликанов (в %) в секрете бронхов у больных БА по мере нарастания тяжести течения заболевания.

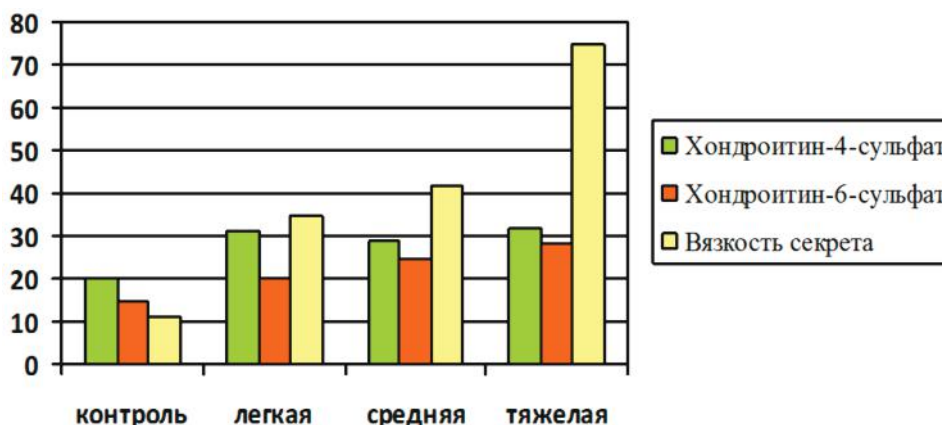


Рис. 2. Вязкоэластические свойства секрета бронхов при различной степени тяжести БА.

Примечание: продемонстрированы средние значения содержания хондроитин-4-сульфатов и хондроитин-6-сульфатов в секрете бронхов (в %) у пациентов в исследуемых группах, и доля пациентов с выраженным повышением вязкоэластических свойств секрета бронхов (в % от числа обследованных в группе).

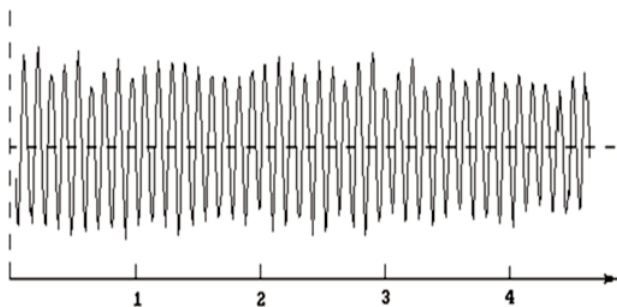


Рис. 3. Запись мерцательной активности реснитчатого эпителия слизистой оболочки бронхов у здорового добровольца. Частота биения ресничек 11,1 Гц. Ось абсцисс – время (с), ось ординат – амплитуда колебаний.

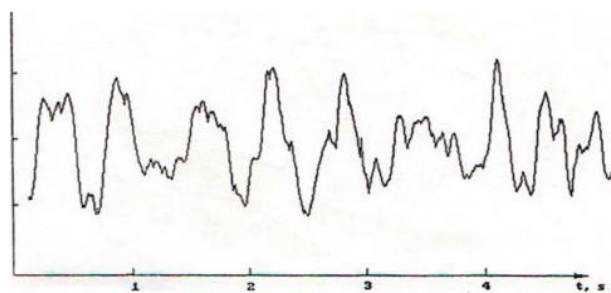


Рис. 4. Запись мерцательной активности реснитчатого эпителия слизистой оболочки бронхов у больного тяжелой БА. Частота биения ресничек 1,5 Гц. Ось абсцисс – время (с), ось ординат – амплитуда колебаний.

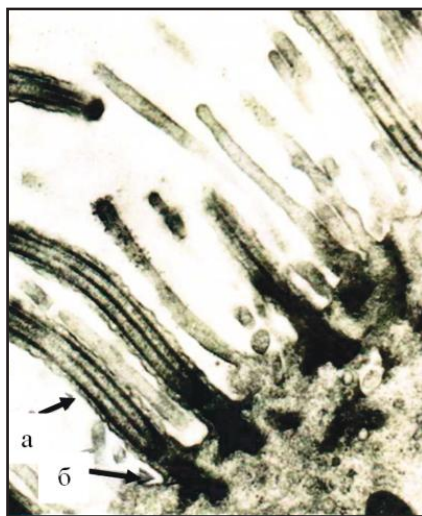


Рис. 5. Слизистая оболочка бронхов. Апикальный полюс мерцательной клетки с располагающимися на нем ресничками. Тело реснички (а) и базальное тельце (б), в котором сосредоточена АТФ и сукцинатдегидрогеназа. Электронная микроскопия. Увеличение: 20000.

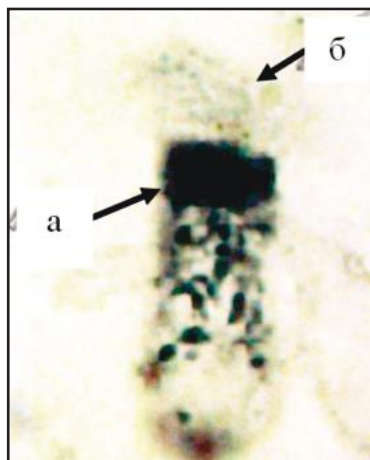


Рис. 6. Мерцательная клетка слизистой оболочки бронха пациента, не болеющего БА. На апикальном полюсе клетки в базальном тельце (а) сосредоточен большой запас АТФ, который связан с ресничками (б). Гистохимическая реакция на АТФ-азу по Wachstein-Meisel. Увеличение 15×100.



Рис. 7. Мерцательная клетка слизистой оболочки бронха пациента с тяжелой формой БА. В базальном тельце незначительное содержание АТФ. Реснички в небольшом количестве. Гистохимическая реакция на АТФ-азу по Wachstein-Meisel. Увеличение 15×100.

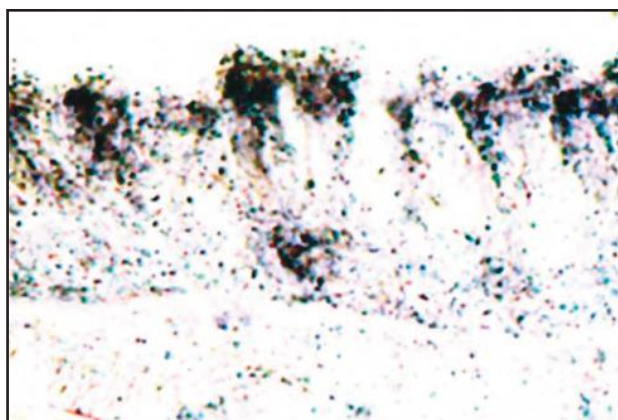


Рис. 8. Срез слизистой оболочки бронха у пациента, не болевшего БА. Мерцательные клетки сохранены. На апикальном полюсе большое количество ресничек. В базальных тельцах большое скопление АТФ. Реакция на АТФ по Wachstein-Meisel. Увеличение: 10×100.

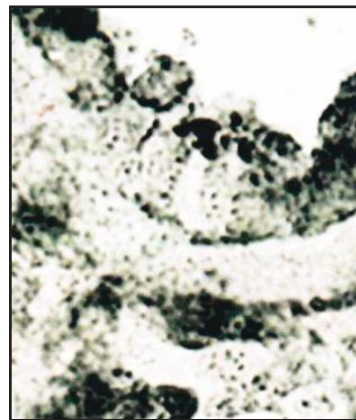


Рис. 9. Срез слизистой оболочки бронха у пациента с тяжелой формой БА. Оставшиеся мерцательные клетки лишены ресничек. В базальных тельцах незначительное количество АТФ. Реакция на АТФ по Wachstein-Meisel. Увеличение: 10×100.

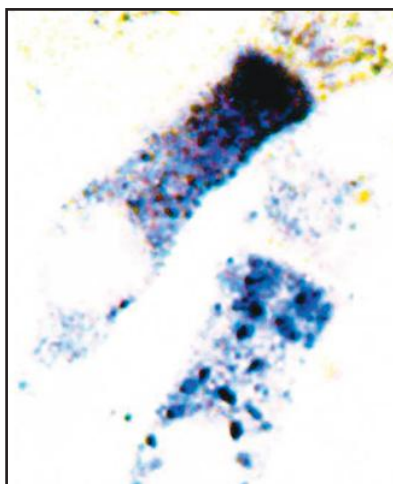


Рис. 10. Мерцательные клетки слизистой оболочки бронха пациента, не болеющего БА. В базальном тельце высокая активность сукцинатдегидрогеназы. Реакция на сукцинатдегидрогеназу по Шелтон-Шнейдеру. Увеличение: 15×100.

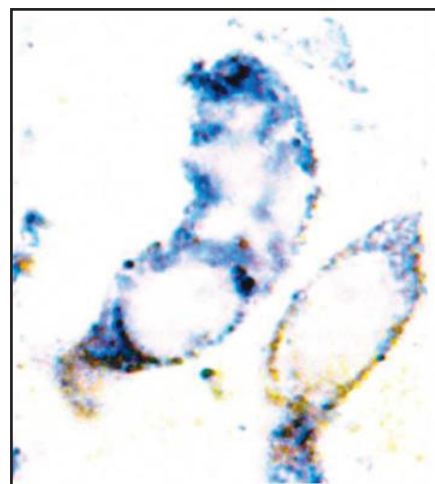


Рис. 11. Мерцательные клетки слизистой оболочки бронха пациента с тяжелой БА. Клетка лишена ресничек, низкая реакция на сукцинатдегидрогеназу. Реакция на сукцинатдегидрогеназу по Шелтон-Шнейдеру. Увеличение: 15×100.

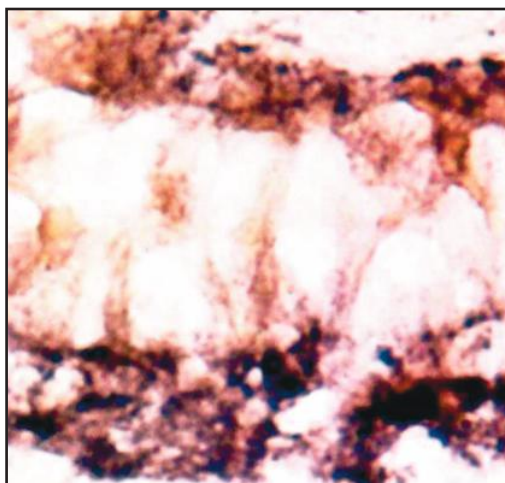


Рис. 12. Участок слизистой оболочки бронха пациента, не болеющего БА. Высокая активность сукцинатдегидрогеназы в клетках слизистой оболочки. Реакция на сукцинатдегидрогеназу по Шелтон-Шнейдеру. Увеличение: 10×100.

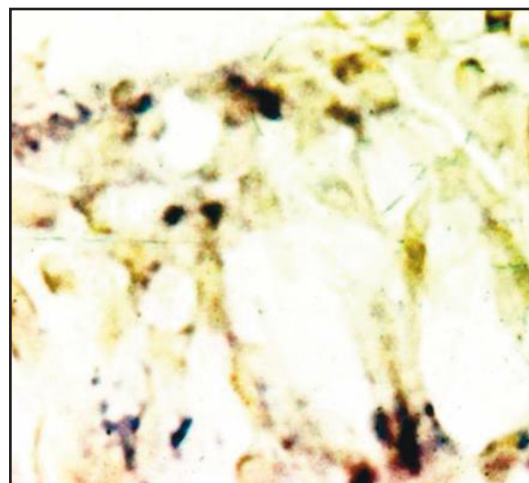


Рис. 13. Участок слизистой оболочки бронха пациента с тяжелой формой БА. В клетках слизистой низкая реакция на сукцинатдегидрогеназу. Клетки лишены ресничек. Реакция на сукцинатдегидрогеназу по Шелтон-Шнейдеру. Увеличение: 10×100.

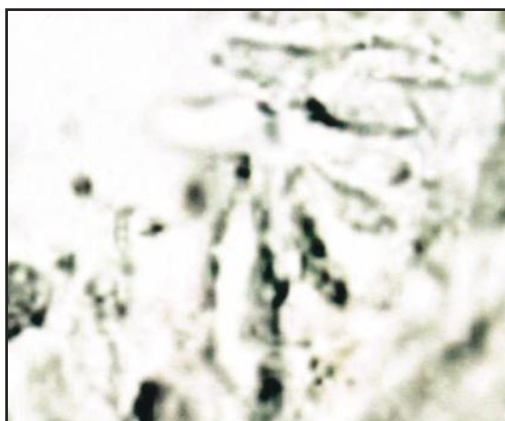


Рис. 14. Участок слизистой бронха пациента, не болеющего БА. В клетках слизистой незначительная реакция на перекиси жирных кислот. Реакция на перекиси по Винклеру-Шульце. Увеличение: 10×100.



Рис. 15. Участок слизистой оболочки бронха пациента с тяжелой БА. В клетках резко увеличена реакция на перекиси жирных кислот. Реакция на перекиси по Винклеру-Шульце. Увеличение: 10×100.

Обсуждение результатов исследования

Мукоцилиарная система состоит из трех функционально связанных компонентов: реснитчатого эпителия, перилициарного слоя секрета и собственно слизи [10].

Движение ресничек происходит в перилициарном слое. В норме реснички движутся координировано с соседними, формируя однонаправленное передвижение слизи. Сами реснички совершают свои движения двуфазно: сильного удара и медленного возврата движения [14].

В составе эпителия слизистой бронхиального пути легких на долю мерцательных клеток в норме приходится до 75%. От частоты биения ресничек зависит эффективность работы мукоцилиарного клиренса.

Степень тяжести БА зависит от повреждения эпителиального слоя слизистой оболочки бронхов и особенно выпадения из строя двигательной функции ресничек мерцательных клеток.

Процесс нарушения эффективности работы мукоцилиарного клиренса у больных БА нужно рассматривать, прежде всего, с повреждения слизистой оболочки бронхиальных путей вследствие хронического воспалительного процесса. В это время в соединительной ткани слизистой постепенно накапливается большое количество тучных клеток и макрофагов, вырабатывающих биогенно активные вещества, и такие интерлейкины, как TNF α . Под их влиянием в реснитчатых клетках на всем протяжении слизистой бронхов в мембранах мерцательных клеток формируется большое количество перекисей жирных кислот (рис. 14, 15), под воздействием которых нарушается функциональная активность энергетической зоны мерцательных клеток – базальных телец (рис. 9). Снижается активность ферментов, принимающих участие в цикле окислительного фосфорилирования (сукцинатдегидрогеназа) и формировании основного энергетического материала – АТФ (рис. 11, 13).

Активность ресничек вначале снижается, а затем часть из них гибнет. Это можно наблюдать уже при легкой и средней степени тяжести БА. При затянувшемся воспалительном процессе наблюдается массовая гибель мерцательных клеток и слущивание их в просвет бронхов. Эпителий слизистой вначале перестраивается, принимая форму многослойного пласта, а затем при тяжелой форме астма не удерживается на базальной мембране, превращаясь в клетки цилиндрической или кубической формы. При таких изменениях в эпителии слизистой оболочки бронхов передвижение слизи, вырабатываемой подслизистыми железами бронхов, богатой хондроитинсульфатами, не может эвакуироваться из бронхов, так как мукоцилиарная система сильно повреждена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия. Будапешт: изд-во АН Венгрии, 1962. 399 с.
2. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 645 с.

3. Лойда З., Гроссрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М.: Мир. 1982. 270 с.

4. Луценко М.Т., Коненков В.И., Пирогов А.Б. Механизмы этиопатогенеза бронхиальной астмы. Новосибирск; Благовещенск: Амурский государственный университет, 2002. 240 с.

5. Одиреев А.Н., Андриевская И.А., Луценко М.Т. Вклад изменений в системе медиаторов воспаления в формирование мукоцилиарной недостаточности у больных бронхиальной астмой // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2008. Вып.29. С.18–21.

6. Одиреев А.Н., Чжоу С.Д., Ли Ц., Колосов В.П., Луценко М.Т. Нарушения мукоцилиарного клиренса при бронхиальной астме // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2010. Вып.37. С.15–21.

7. Heald R. A dynamic duo of microtubule modulators // *Nat. Cell Biol.* 2000. Vol. 2, №1. P. E11–E12.

8. Hirokawa N., Takemura R. Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins // *Trends Biochem. Sci.* 2003. Vol.28, №10. P.558–565.

9. Howard J., Hyman A.A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end // *Nature.* 2003. Vol.422, №6933. P.753–758.

10. Mall M.A. Role of cilia mucus and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models // *J. Med. Pulm. Drug. Deliv.* 2008. Vol.21, №1. P.13–24.

11. Pollard T. Polymerization of ADP-actin // *J. Cell. Biol.* 1984. Vol.99, №3. P.769–777.

12. Pollard T., Borisy G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments // *Cell.* 2003. Vol.112, №4. P.453–465.

13. dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A., Nosworthy N.J. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments // *Physiol. Rev.* 2003. Vol.83, №2. P.433–473.

14. Teff Z., Priel Z., Gheber L.A. Forces applied by cilia measured on explants from mucociliary tissue // *J. Biophys.* 2007. Vol.92, Iss.5. P.1813–1823.

15. Zigmond S.H. Formin-induced nucleation of actin filaments // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2004. Vol.16, №1. P.99–105.

16. Zigmond S.H. Beginning and ending an actin filament: control at the barbed end // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2004. Vol.63. P.145–188.

REFERENCES

1. Kisseli D. Practical microtechnology and histochemistry. Budapest; 1962.
2. Lillie R.D. Histopathologic technic and practical histochemistry. Moscow: Mir; 1969 (in Russian).
3. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T.H. Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Moscow: Mir; 1982.
4. Lutsenko M.T., Konenkov V.I., Pirogov A.B. Mechanisms of etiopathogenesis of asthma. Novosibirsk; Blagoveshchensk; 2002.
5. Odireev A.N. Andrievskaya I.A. Lutsenko M.T. The contribution of changes in the system of inflammation mediators to the formation of mucociliary insufficiency in pa-

tients with bronchial asthma. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2008; 29:18–21.

6. Odireev A.N., Zhou S.D., Lee C., Kolosov V.P., Lutsenko M.T. Mucociliary clearance disturbances in bronchial asthma. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2010; 37:15–21 (in Russian).

7. Heald R. A dynamic duo of microtubule modulators. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2(1):E11–E12.

8. Hirokawa N., Takemura R. Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem. Sci.* 2003; 28(10):558–565.

9. Howard J., Hyman A.A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 2003; 422(6933):753–758.

10. Mall M.A. Role of cilia mucus and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models. *J. Med. Pulm. Drug. Deliv.* 2008; 21(1):13–24.

11. Pollard T. Polymerization of ADP-actin. *J. Cell. Biol.* 1984; 99(3):769–777.

12. Pollard T., Borisy G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; 112(4):453–465.

13. dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A., Nosworthy N.J. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 2003; 83(2):433–473.

14. Teff Z., Priel Z., Gheber L.A. Forces applied by cilia measured on explants from mucociliary tissue. *J. Biophysical.* 2007; 92(5):1813–1823.

15. Zigmond S.H. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2004; 16(1):99–105.

16. Zigmond S.H. Beginning and ending an actin filament: control at the barbed end. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2004; 63:145–188.

Поступила 18.10.2016

Контактная информация

Михаил Тимофеевич Луценко,

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор,
руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза
и восстановительных процессов дыхательной системы при НЗЛ,
Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22. E-mail: lucenkomt@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Mikhail T. Lutsenko,

MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS,

Head of Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis

and Recovery Processes of the Respiratory System at Non-Specific Lung Diseases,

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration,

22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: lucenkomt@mail.ru