

Кремис Иван Сергеевич

**ФАКТОРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К РАЗВИТИЮ ХРОНИЧЕСКОЙ
ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ
ВОЗДЕЙСТВИИ ТАБАЧНОГО ДЫМА**

14.01.25 – пульмонология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Букреева Екатерина Борисовна
Геренг Елена Андреевна

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Шпагина Любовь Анатольевна

заведующий кафедрой госпитальной терапии и медицинской реабилитации педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

Гущин Михаил Юрьевич

старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», кандидат медицинских наук

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Защита состоится «__» _____ 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава и на сайте www.ssmu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Агеева Т.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) - широко распространенное неуклонно прогрессирующее заболевание бронхо-легочной системы, которое приводит к существенному снижению качества жизни, обуславливает раннюю инвалидизацию и высокую смертность больных. [Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., 2013, 2014]. В последние годы отмечается неуклонный рост данной патологии с поражением наиболее трудоспособной части населения в возрасте от 30 до 40 лет. По данным ВОЗ в настоящее время во всем мире страдают ХОБЛ приблизительно 600 млн. человек, а в 2020 г. их число удвоится и будет занимать 3 место среди других болезней [World Health Organization, 2017; GOLD, 2017]. По заключению ЦНИИ организации и информатизации здравоохранения Министерства здравоохранения РФ, за период с 2005 до 2012 г., заболеваемость ХОБЛ в Российской Федерации увеличилась на 27% и составила 668,4 на 100 тыс. населения [Стародубов В. И., Леонов С. А., Вайсман Д. Ш., 2013].

ХОБЛ является мультифакториальным заболеванием, в основе патогенеза которого лежат как сложные тканевые, клеточные и молекулярные взаимодействия в организме, так и взаимосвязь генетических факторов с условиями внешней среды [Авдеев С. Н., 2014; Визель А. А., 2015].

На сегодняшний день курение табака является наиболее важным экзогенным фактором риска развития ХОБЛ. Рост заболеваемости и смертности у больных ХОБЛ связывают с увеличением распространенности курения. Было доказано, что хронический бронхит имеет место практически у каждого курильщика, но ХОБЛ развивается только у 50% курящих лиц [GOLD, 2017]. Данный факт указывает на наличие у каждого конкретного индивидуума определенных наследственных факторов, модифицирующих влияние курения. Возможно, у лиц с определенным генотипом, пролонгированное воздействие такого агрессивного фактора, как табачный дым, приводит к срыву взаимоотношений между функционально ведущей тканью и стромой, что сопровождается развитием патологического процесса в бронхиальной стенке. В этой связи, поиск тканевых, клеточный и молекулярных маркеров предрасположенности к формированию ХОБЛ, а также изучение особенностей состояния бронхиального дерева у курящих людей является важной задачей современной пульмонологии.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время ведется активное исследование этиологии, патогенеза, патоморфологии бронхолегочных заболеваний, в частности ХОБЛ. Большая часть работ направлена на исследование морфофункциональных, иммунологических и биохимических характеристик слизистой оболочки бронхов у курильщиков с ХОБЛ - детальное изучение реакции слизистой оболочки бронхов на длительное воздействие табачного дыма. В большинстве современных исследований изучались курильщики, лица, прекратившие курить и не курящие люди, без патологии органов дыхания и лишь небольшое количество работ посвящено

комплексному сравнительному анализу курильщиков с ХОБЛ и курильщиков резистентных к развитию данного заболевания. Наиболее современные и актуальные исследования причин резистентности слизистой оболочки бронхов к развитию ХОБЛ у курильщиков свидетельствуют о ключевой роли макрофагов, дендритных клеток, лимфоцитов в дыхательных путях, а также митохондриальной дисфункции [Chung K.F., 2017; Zhang L, 2017; Prakash Y.S., 2017] и стресса эндоплазматической сети (ЭПС), в частности эффективности механизма «ответа на мисфолдинг» (unfoldedproteinresponse, UPR), наблюдаемое в эпителиальных клетках бронхиальной стенки [Ribeiro C.M., 2012; Blumental-Perry A, 2012; Hoffmann R.F., 2013; Wang Y. 2017; Tan SX., 2017; He B., 2018]. В настоящее время нет целостного представления о морфо-функциональных механизмах резистентности бронхиальной стенки к развитию ХОБЛ у курильщиков, что свидетельствует об актуальности исследований в этой области.

Цель работы

Цель диссертационной работы – установить тканевые, клеточные и молекулярные механизмы резистентности слизистой оболочки бронхов к развитию ХОБЛ у курильщиков.

Задачи исследования

1. Оценить морфофункциональное состояние слизистой оболочки бронхов у курильщиков, страдающих и не страдающих ХОБЛ.
2. Выявить ультраструктурные особенности слизистой оболочки бронхов у курильщиков, страдающих и не страдающих ХОБЛ.
3. Изучить биохимические, цитологические и иммунологические показатели бронхиального секрета (индуцированная мокрота и бронхиальные смывы) у курильщиков, страдающих и не страдающих ХОБЛ.
4. На основе оценки тканевых, клеточных и молекулярных параметров слизистой оболочки бронхов установить факторы устойчивости компонентов бронхиальной стенки к развитию ХОБЛ при длительном воздействии табачного дыма.

Научная новизна

На основании гистологического, электронно-микроскопического, иммунологического, биохимического исследования впервые выявлены тканевые, клеточные и молекулярные маркёры резистентности слизистой оболочки бронхов (СОБ) к формированию морфофункциональных изменений бронхиальной стенки и развитию ХОБЛ при длительном воздействии табачного дыма у курильщиков. Проведен комплексный сравнительный анализ структурной архитектоники бронхиальной стенки у курильщиков с ХОБЛ и без нее.

Впервые установлены структурные и функциональные особенности собственной пластинки СОБ у курильщиков без клинических признаков ХОБЛ, отражающие реакцию дыхательных путей на воздействие табачного дыма. В данной группе были обнаружены морфофункциональные изменения, которые на электронно-микроскопическом уровне проявлялись в гиперплазии и гиперфункции белок-синтетического и энергетического аппарата в реснитчатых и

бокаловидных эпителиоцитах и повышении числа микропиноцитозных везикул и цитоплазматических выростов в эндотелиальных клетках сосудов бронхов.

У курильщиков с ХОБЛ впервые дана комплексная характеристика состояния СОБ, что выражалось в значительной структурной дезорганизации эпителиального пласта с преобладанием дистрофических процессов над воспалительными изменениями, с ультраструктурными признаками регенераторно-пластической недостаточности в бронхиальных эпителиоцитах (деградация цитоплазматического матрикса, расширение и вакуолизация гранулярной ЭПС, уплотнение митохондриального матрикса, набухание митохондриальных крист), а также морфологические признаки капилляротрофического дефицита в эндотелиоцитах сосудов бронхов.

Получены новые знания, основанные на данных морфологического исследования, подтверждающие развитие стресса ЭПС, нарушения функционирования сложного гомеостатического механизма, известного как «ответ на мисфолдинг» (unfolded protein response, UPR), а также митохондриальной дисфункции в клетках бронхиального эпителия при длительном воздействии табачного дыма, ассоциированном с ХОБЛ.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе проведенной работы получены новые знания фундаментального характера, раскрывающие особенности реакции СОБ на длительное воздействие табачного дыма с развитием ХОБЛ и без развития данного заболевания. У пациентов с ХОБЛ в СОБ выявлены ключевые морфофункциональные маркеры прогрессирования заболевания: удельный объем (УО) базальных эпителиоцитов и покровного эпителия, УО ЭПС в бокаловидных и базальных эпителиоцитах.

Определен ряд цитологических (количество макрофагов, нейтрофилов и бронхиального эпителия с признаками дистрофии), иммунологических и биохимических показателей (определение концентрации интерлейкина-8,10, фактора некроза опухоли альфа, трансформирующего фактора роста $\beta 1$, активности эластазы и $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора) при исследовании бронхиальных смывов (БС) и индуцированной мокроты (ИМ) как предикторов развития ХОБЛ. Взаимосвязи этих показателей с другими важными морфологическими и клинико-функциональными параметрами (ОФВ1/ФЖЕЛ, индекс курения, длительность синдрома одышки, частота обострения заболевания), позволяют использовать исследуемые показатели в ИМ и БС при скрининговой диагностике ХОБЛ и формировании групп высокого риска развития заболевания. Анализ групп высокого риска позволит реализовывать эффективные превентивные профилактические мероприятия и, возможно, разработать таргетные методы патогенетической терапии ХОБЛ.

Методология и методы исследования

Дизайн исследования и набор используемых в работе методов позволяет получить достоверную информацию о структурных особенностях слизистой оболочки бронхов у курильщиков, взаимосвязи ряда морфологических, иммунологических маркеров с ключевыми клинико-функциональными тестами, а также установить факторы резистентности к развитию ХОБЛ. В работе

использован комплекс современных клинико-функциональных, морфологических, морфометрических, электронно-микроскопических, биохимических, статистических методов исследования. Многогранность методик исследования, использованных в работе, обеспечивает получение достоверной информации об особенностях и характеристиках реакции СОБ на длительное воздействие табачного дыма.

Положения, выносимые на защиту

1. У курильщиков без ХОБЛ сохранялось типичное строение слизистой оболочки бронхов при минимальных воспалительных и дистрофических изменениях в эпителиоцитах на фоне гиперплазии бокаловидных клеток и белково-слизистых желез бронхов.

2. У курильщиков с ХОБЛ выявлены морфофункциональные признаки ремоделирования бронхиальной стенки с развитием нарушений транскапиллярного обмена, эндотелиальной дисфункцией и истощением структурно-метаболических резервов эпителиальных клеток бронхов.

3. При длительной экспозиции табачного дыма маркерами резистентности слизистой оболочки бронхов к развитию ХОБЛ на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях являются: сохранение нормальных показателей объемной плотности покровного эпителия; увеличение количества макрофагов при отсутствии значимого увеличения количества нейтрофилов на фоне сохранения нормальных концентраций TNF- α , ИЛ-8 в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте; сохранение нормальной объемной плотности ЭПС и митохондрий в эпителиальных клетках при увеличении удельного объема микропиноцитозных везикул в эндотелиоцитах капилляров бронхиальной стенки.

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты используются в учебном процессе кафедры пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии педиатрического факультета СибГМУ в разделе «Болезни органов дыхания» и кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ в разделе «Патология органов дыхания. Дыхательная недостаточность. Одышка».

Степень достоверности и апробация работы

Высокая степень достоверности полученных результатов обеспечивается использованием комплекса современных и фундаментальных методик, достаточным, с точки зрения принципов доказательной медицины, объемом клинического материала (115 пациентов) и разносторонними подходами к статистическому анализу количественных данных.

Основные положения диссертации доложены и представлены на XI международном конгрессе «Здоровье и образование XXI века» (Москва, 2010); международной конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010); III Эмбриональном симпозиуме Международной ассоциации морфологов «Югра-Эмбрио-2011» «Закономерности эмбриофетальных морфогенезов у человека и позвоночных животных» (Ханты-Мансийск, 2011) ; X, XII, XIV конгрессах Международной ассоциации морфологов (Ярославль, 2010; Тюмень 2014;

Астрахань, 2018); в рамках сессии постерных докладов на Европейском респираторном конгрессе в Амстердаме (2015) и Лондоне (2016).

По теме диссертации опубликовано 11 полнотекстовых статей в журналах из перечня ВАК РФ.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 180 страницах машинописного текста, иллюстрирована 47 рисунками и 25 таблицами, содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы. Список использованной литературы содержит 268 источников, из них 55 отечественных и 213 иностранных.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в планировании работы. Результаты получены и проанализированы автором лично. Автор самостоятельно выполнил статистический, научный анализ, интерпретацию полученных результатов и сформулировал выводы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Дизайн исследования. Объект исследования

Дизайн и задачи исследования соответствовали одномоментному исследованию. Все обследованные пациенты были разделены на две группы – курильщики с диагнозом ХОБЛ (основная группа, n=83); курильщики без ХОБЛ (группа сравнения, «здоровые» курильщики, n=32). Весь биологический материал анализировался лично автором.

Работа выполнена на базе Сибирского государственного медицинского университета (кафедры внутренних болезней педиатрического факультета, кафедры морфологии и общей патологии медико-биологического факультета, и ОГАУЗ "Городская клиническая больница №3" (отделение пульмонологии, патологической анатомии, поликлиническое отделение, клинической и биохимической лабораторий).

С целью отбора пациентов для исследования были разработаны критерии включения/исключения.

Критерии включения в основную группу (курильщики с диагнозом ХОБЛ):

1. Верифицированный диагноз ХОБЛ;
2. Длительный стаж курения (не менее 20 лет);
3. Возраст от 45 до 65 лет;

Критерии включения в группу сравнения («здоровые» курильщики, курильщики без ХОБЛ, курящие лица без ХОБЛ):

1. Отсутствие верифицированного диагноза ХОБЛ по данным спирометрии (клинико-функциональные тесты в пределах нормы);
2. Длительный стаж курения (не менее 20 лет);
3. Возраст от 45 до 65 лет;

Критерии исключения из исследования:

1. Нежелание пациента принимать участие в исследовании, отсутствие информированного согласия;

2. Наличие тяжелых сопутствующих заболеваний, злокачественных новообразований или других хронических заболеваний в стадии декомпенсации.
3. Наличие других заболеваний бронхолегочной системы: верифицированный диагноз бронхиальной астмы, дефицит α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ), бронхоэктатическая болезнь, буллезная эмфизема легких, кисты легких, асбестоз, резекция части легких или их трансплантация; перенесшие тяжелые формы туберкулеза легких, травмы грудной клетки;
4. Наличие психических расстройств, прием психотропных и наркотических препаратов;

Под наблюдением находилось 115 курильщиков. Все обследованные в ходе работы пациенты были «злостными» курильщиками: оценка индекса курения показала, что интенсивность курения составляла в среднем 45 (35-65) пачка-лет. По окончании формирования выборки, курильщиков произвели деление на группы: основная, 83 человека с верифицированным диагнозом ХОБЛ, и группа сравнения (курильщики без ХОБЛ) в количестве 32 человек. Разделение пациентов на две группы производилось на основании результатов спирометрического обследования (табл. 1).

Таблица 1

**Сравнительная клиничко-функциональная характеристика
обследованных групп пациентов, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})**

Показатели	Группа сравнения, (n=32)	Основная группа, (n = 83)	p
ОФВ1 (до БД)	90,6 (88,0-102,2)	42,3 (28,7-55,1)	p=0,001
ОФВ1(после БД)	95,8 (88,1-107,3)	41,0 (31,0-54,8)	p=0,001
ФЖЕЛ (после БД)	100,7 (93,6-112,6)	79,5 (68,3-92,5)	p=0,001
ОФВ1/ФЖЕЛ	74,0 (69,0-78,0)	41,3 (33,2-50,9)	p=0,001

Примечание: n – количество пациентов; p–статистическая значимость различий;

Согласно рекомендациям GOLD 2011, 2017, диагноз ХОБЛ был верифицирован на основании данных анамнеза, клинической картины заболевания (продуктивный кашель, одышка), объективного обследования (бронхообструктивный синдром, признаки эмфиземы), спирометрического исследования (снижение ОФВ1, снижение отношения ОФВ1/ФЖЕЛ менее 70%). У 2 пациентов (1,2 %) была выявлена 1 степень тяжести бронхообструкции ХОБЛ, у 23 (28,9%) – 2 степень; у 33 (40,7%) – 3 степень и в 24 случаях (29,6%) выявлена 4 степень.

Одышка была выявлена у всех пациентов группы курильщиков с ХОБЛ, длительность симптома составила в целом по выборке 5 (2-10) лет, а возраст ее возникновения соответственно 52 (45-60) лет.

Данное исследование одобрено локальным комитетом по этике ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России г. Томска № 2833/1 от 31.11.2011.

2. Материал исследования

Материалом исследования были биоптаты слизистой оболочки правого среднедолевого бронха (СОБ) и бронхиальные смывы (БС), полученные во время бронхоскопии, проводимой по стандартной методике (Robinson D.S., 1998), а

также бронхиальный секрет, взятый в процессе индуцированного мокротоотделения у курильщиков с ХОБЛ и без данного заболевания.

3. Методы исследования

Для решения поставленных задач были использованы клинико-функциональные, морфологические, морфометрические, электронно-микроскопические, цитологические, биохимические, а также методы статистического анализа данных. Клинико-функциональные методы включали спирометрию, ЭКГ, УЗИ сердца с исследованием фракции выброса ЛЖ (%), толщины стенки правого желудочка (мм) и наличия легочной гипертензии (мм рт.ст).

3.1. Исследование вентиляционной функции легких

Благодаря оборудованию фирмы Jaeger, Германия (1998 год) и программному обеспечению МастерСкрин Пневмо нами исследовалась функция внешнего дыхания путем анализа кривой «поток - объем» и показателей спирометрии. Согласно протоколу исследования, все пациенты за 8 часов до проведения всех манипуляций не принимали антихолинэргические препараты, а также симпатомиметики, метилксантины короткого действия, теофиллины и β -агонисты пролонгированного действия. После проведения исследования проводилась компьютерная обработка полученных данных с вычислением должных величин и регистрацией их в системе ВТРС. Перед проведением данных манипуляций все пациенты были проинструктированы и обучены выполнению дыхательных маневров. Перед исследованием проводилась проба с бронхолитиками (сальбутамол в дозе 400 мкг (4 дозы)) [Калманова Е.Н., Айсанов З.Р., 2000]. Спирометрия анализировалась по следующим показателям: объем форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1) до и после пробы с бронхолитиком, прирост ОФВ1 после пробы с бронхолитиком в миллилитрах и процентное соотношение от исходного показателя. отношение ОФВ1/ФЖЕЛ (модифицированный индекс Тиффно), жизненная емкость легких (ЖЕЛ)

3.2. Цитологическое исследование индуцированной мокроты и бронхиальных смывов

Индуцированную мокроту (ИМ) получали после ингаляций стерильного 3, 4, 5 % раствора NaCl через ультразвуковой небулайзер «Ультра НЕБ 2000» (Авдеев С.Н., 1998). Бронхиальные смывы (БС) получали путем дробного введения в тубус бронхоскопа стерильного изотонического раствора NaCl, подогретого до 37 °С, общим объемом 40–60 мл с немедленной аспирацией в специальный силиконизированный контейнер (Полосухин В.В., 2000). В БС и ИМ подсчитывали относительное (%) и абсолютное количество клеток в 1 мл. В цитологических препаратах, окрашенных азуром-П-эозином, идентифицировали не менее 300 клеток с подсчетом следующих типов клеточных популяций: макрофагов (МФ), нейтрофилов (НФ), эозинофилов (ЭФ), лимфоцитов (ЛФ), бронхиальных эпителиоцитов обычного строения, бронхиальных эпителиоцитов с признаками дистрофии (БЭСД), бокаловидных клеток. Цитологическая характеристика клеток анализируемых в цитограммах биологических жидкостей

проводилась согласно их морфологическому описанию (Ройт А., 1991; Шапиро Н.А., 2005).

3.3 Морфологическое исследование слизистой оболочки бронхов

Бронхоскопическое исследование с получением бронхобиоптатов реализовывалось в условиях фибробронхоскопического кабинета, утром, натощак.

Основным показанием для проведения эндоскопического исследования у исследуемых групп пациентов явилась необходимость уточнения диагноза, а также с целью исключения других болезней органов дыхания.

С помощью фибробронхоскопа BF-P20D (Olimpus, Япония) осуществлялась визуализация структур бронхиального дерева и производился забор щипковых биопсий (3-4 фрагмента) со слизистой оболочки правого среднедолевого бронха. Одну часть гистологического материала фиксировали в 10-12% забуференном растворе формалина в течение 24 часов, затем использовали для гистологических и гистохимических методов исследования [Лили Р., 1999; Меркулов Г.А., 2004]. Другую часть бронхобиоптатов подвергали фиксации в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,2 М какодилатном буфере с рН=7,2 при температуре +40С и далее подвергали дополнительной фиксации в 1% растворе OsO₄ на холоде в течение 4 часов для проведения ультраструктурных анализов [Карупу В.Я., 1984].

3.3.1. Гистологические методы исследования

Бронхобиоптаты, использовали для приготовления гистологических препаратов по стандартным методикам [Меркулов Г.А., 2004]. Обзорную микроскопию и морфометрию осуществляли на микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Для анализа выраженности фиброза использовали окраску пикрофуксином по Ван-Гизону [Лили Р., 1969; Меркулов Г.А., 2004].

3.3.2 Морфометрическое исследование

Морфологическое исследование бронхобиоптатов осуществлялось под световым микроскопом Karl Zeis «Axioskop 40 FL» с оценкой выраженности воспалительных, дисрегенераторных (пролиферация базальных клеток, наличие плоскоклеточной метаплазии и бокаловидноклеточной гиперплазии), а также фиброзных изменений.

На цифровой фотокамере Canon Power Shot A 630 производили съемку гистологических препаратов (7-10 случайных полей зрения для каждого среза). Цифровые фотографии подвергали морфометрическому исследованию с использованием компьютерной программы ImageJ 1.43. (режим доступа <http://www.rsb.info.nih.gov/ij/>). За единичный объем принимали 1 мм² ткани бронхов. С помощью метода точечного счета Автандилова с использованием Plugins «Grid» в бронхобиоптатах подсчитывали объемные плотности следующих структур (мм³/мм³): покровного эпителия, отдельных клеточных форм, соединительной ткани, желез, сосудов микроциркуляторного русла. Используя окуляр-микрометр определяли высоту эпителиального пласта, а также толщину базальной мембраны (мкм) [Глаголев В.В., 1988; Гуцол А.А., 1999]. При помощи Plugins «Cell» программы ImageJ в 1 мм² собственной пластинки слизистой

оболочки подсчитывали плотность фибробластов, воспалительного инфильтрата и различных клеточных популяций (МФ, ЛФ, НФ, ЭФ), а также число их межэпителиальных форм.

3.3.3 Методы электронно-микроскопического исследования

Образцы бронхиоцитов не более 2 мм³ после предварительной фиксации и посфиксации подвергали дегидратации в этаноле восходящей концентрации, заливали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB III (Швеция). Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали 1% раствором толуидинового синего или азура II просматривали в световом микроскопе. Ультратонкие срезы толщиной 60-100 нм наносили на сетки-подложки с формваровой пленкой-подложкой и контрастировали 2% раствором уранилацетата и цитратом свинца.

Препараты просматривали в электронном микроскопе «JEM-100 CXII» (JEOL, Япония) с апертурной диафрагмой 25-30 мкм при ускоряющем напряжении 80 кВ. Описание и морфометрию ультраструктур проводили на оцифрованных негативных фотопластинках с начальным увеличением 4800 – 12000 с помощью программ обработки графических изображений. Вычисляли удельный объем внутриклеточных структур, используя метод точечносчетной морфометрии [Автандилов Г.Г., 2006]. На электронных микрофотографиях в реснитчатых, бокаловидных и базальных клетках подсчитывали удельный объем (УО) следующих органоидов (мкм³/мкм³): митохондрий, ЭПС, лизосом, а также определяли УО капилляров (мкм³/мкм³) микроциркуляторного русла СОБ и подсчитывали объемную плотность микропиноцитозных везикул на люминальной поверхности сосудов (мкм³/мкм³), УО секреторных гранул Вейбеля – Палади (%), их диаметр (нм).

3.4. Биохимический анализ бронхиальных смывов и индуцированной мокроты

Регистрацию функциональной активности эластазы и α 1-ПИ осуществляли в БС и ИМ. Протеолитическая активность эластазы определялась спектрофотометрически по скорости гидролиза п-нитрофенилового эфира N-бутилоксикарбонил-L-аланина в зависимости от прироста оптической плотности при длине волны 347 нм; функционирование α 1-ПИ оценивали по торможению аргинин-эстеразной активности трипсина при длине волны 253 нм (Оглоблина О.Г., 1984; Mulgrew A.T., 2004).

3.5 Иммунологическая оценка показателей бронхиальных смывов и индуцированной мокроты

В надсадке БС и ИМ с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию основных иммунорегуляторных молекул и цитокинов – INF- γ , ИЛ-4 и их соотношения, ИЛ-8, ИЛ-10, TNF- α , а также TGF- β ₁ («Вектор-Бест» Новосибирск, «Roche» Швеция). Количественное определение этих иммунорегуляторных молекул основано на методе твердофазного иммуноферментного анализа типа сэндвич. В реализации этого метода принимали участия 4 реагента: моноклональные антитела к INF- γ , ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, TNF- α , TGF β ₁, иммуноцитокнины в исследуемом образце, биотинилированные антитела к

исследуемым молекулам, стрептовидин-пероксидазная система визуализации. Результаты учитывали с применением спектрофотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации исследуемых цитокина в образце.

3.6. Статистические методы исследования

Статистический анализ полученных данных осуществляли при помощи лицензионного пакета программ «Statistica for Windows 6.0» («Stat Soft, Inc.», USA, 1984-2001) [Боровиков В.М., 2001]. При обработке применяли методы описательной и непараметрической статистики. Плотность распределения анализировалась с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Данные представляли в виде медианы (Me), меру рассеяния – в виде квартильного интервала ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Проверку статистической значимости различий производили с использованием непараметрического критерия U-критерий Манна – Уитни (сравнения попарно независимых групп данных между группами). Для выяснения значимости различий качественных и ранговых признаков использовали точный тест Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Сопряженность между полученными данными определяли посредством оценки коэффициентов корреляции рангов Спирмена. Корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для решения задач распознавания признаков и оценки роли различных маркеров в ремоделировании бронхиальной стенки использовали дискриминантный анализ. Критическим уровнем значимости считали значение $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления факторов развития резистентности к воздействию табачного дыма у курильщиков, страдающих и не страдающих ХОБЛ было реализовано цитологическое, биохимическое и иммунологическое исследование ИМ и БС, а также морфологическое исследование бронхобиоптатов.

В работе были получены данные, подтверждающие, что у курильщиков, страдающих ХОБЛ в бронхиальной стенке имеется дисбаланс в протеиназ-антипротеиназной системе, реализующийся в повышении функциональной активности эластазы и снижении антипротеиназной защиты ингибитора, что подтверждается обратной корреляцией между исследуемыми маркерами в ИМ и БС ($r = -0,62$, $p = 0,001$). По результатам дискриминантного анализа оценке функциональной активности эластазы и $\alpha 1$ -ПИ в ИМ и БС принадлежит ведущая роль в формировании структурных изменений в бронхиальной стенке у курильщиков с ХОБЛ ($\lambda = 0,55$; $F = 42,23$; $p < 0,0001$). При длительной персистенции воспаления нейтрофильная эластаза, а также оксиданты разрушают биологические мембраны, в результате чего развивается выраженная дисфункция внутриклеточных органоидов в эпителиоцитах СОБ с последующим формированием регенераторно-пластического дефицита, что было подтверждено как в нашей работе, так и в ряде других исследований [Аверьянов А.В., 2007; Lockett A.D, 2013].

Результаты наших исследований у курящих пациентов без ХОБЛ показали одновременное увеличение функциональной активности эластазы и $\alpha 1$ -ПИ, что подтверждается прямой корреляцией между исследуемыми маркерами в ИМ и БС ($r= 0,71$, $p=0,0001$). Видимо, у данной группы лиц высокая функциональная активность эластазы, индуцируемая факторами табачного дыма, нивелируется $\alpha 1$ -ПИ, который высвобождается в том числе и из альвеолярных макрофагов, что является одним из механизмов, защищающих бронхиальную стенку и препятствующих развитию ХОБЛ [Черногорюк Г. Э., 2010].

У курильщиков с ХОБЛ, напротив, нарушение структуры и функции молекулы ингибитора ассоциировано не только с воздействием сигаретного дыма, но и со значимо повышенной активностью протеиназ, миелопероксидазы, активных форм кислорода, высвобождающихся из НФ, число которых увеличено во всех исследуемых жидкостях. Вышеперечисленные вещества способны инактивировать активный центр антипротеиназы, что вызывает подавление ее ингибиторных, противовоспалительных свойств и стимулирует повреждение соединительной ткани собственной пластинки СОБ и развитие эмфиземы [Mulgrew A.T., 2004; Barnes P.J., 2008; Zhou Y., 2009; Hill A.T., 2010; Черняев А.Л., 2011]. Возможно, нарушение ингибиторных свойств данного белка у курящих пациентов с ХОБЛ связано и с дефектами его синтеза в альвеолярных макрофагах, что подтверждается прямой корреляцией между альвеолярными макрофагами в ИМ, БС и активностью $\alpha 1$ -ПИ у исследуемых пациентов ($r= 0,79$, $p=0,0091$).

Обнаруженное в нашем исследовании повышение функциональной активности эластазы у курильщиков с ХОБЛ и воздействие ее на развитие ремоделирования бронхиальной стенки подтверждается отрицательной корреляцией между активностью данного фермента в бронхиальном секрете и отношением $ОФВ_1/ФЖЕЛ$ ($r= - 0,87$, $p=0,001$), а также прямыми корреляциями с такими клиническими маркерами, как частота обострений заболевания ($r=0,37$, $p=0,03$) и длительность синдрома одышки ($r=0,35$, $p=0,04$).

При цитологическом исследовании ИМ и БС в группе больных ХОБЛ и в группе сравнения были получены статистически значимые различия по ряду показателей. Нами установлено, что более высокая клеточность ИМ и БС при ХОБЛ, по сравнению с курильщиками, не страдающими этой нозологией, связана с увеличением абсолютного количества НФ, ЛФ, БЭСД на фоне снижения общего числа МФ (табл. 2,3).

Таблица 2

Цитологические показатели индуцированной мокроты в группе сравнения и у курильщиков с ХОБЛ, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Исследуемые параметры (в % отношении/количество $\times 10^6$ /мл)	Группа сравнения, n=32	ХОБЛ, n=83	P
Цитоз	1,59 (1,20-1,80)	2,34 (1,80-2,60)	0,001
Бронхиальный эпителий с признаками дистрофии	$\frac{2,43 (1,60-2,80)}{0,04 (0,02-0,06)}$	$\frac{3,47 (1,60-4,85)}{0,08 (0,03-0,12)}$	$\frac{0,28}{\mathbf{0,021}}$
Макрофаги	$\frac{52,50 (33,66-68,3)}{0,77 (0,54-0,93)}$	$\frac{23,01 (6,90-37,33)}{0,50 (0,15-0,75)}$	$\frac{\mathbf{0,001}}{\mathbf{0,008}}$

Лимфоциты	10,06 (6,5012,6)	10,18 (6,47-13,20)	0,97
	0,16 (0,12-0,22)	0,22 (0,15-0,29)	0,022
Нейтрофилы	32,9(18,9-41,58)	61,33 (46,57-80,9)	0,001
	0,56 (0,12-0,90)	1,48 (0,99-2,02)	0,000

Примечание: здесь и далее в таблицах 3, 4; n – количество пациентов; p – статистическая значимость различий; в числителе – относительное число клеточных популяций (%); в знаменателе – абсолютное число клеточных популяций (количество x 10⁶/мл).

Таблица 3

Цитологические показатели бронхиальных смывов у курильщиков группы сравнения и с ХОБЛ

Исследуемые параметры (в % отношении/ количество x 10 ⁶ /мл)	Группа сравнения, n=32	ХОБЛ, n=83	p
Бронхиальные эпителиоциты обычного строения	21,7 (14,49 – 23,5)	11,3 (6,8 – 20,8)	0,003
	0,23 (0,1373 – 0,29)	0,24 (0,15 – 0,32)	0,74
Макрофаги	36,8 (31,2 -48,965)	14,62 (5,6 – 30,8)	0,000
	0,19 (0,095 – 1,001)	0,14 (0,06 - 0,23)	0,067
Нейтрофилы	29,3 (17,545 – 32,4)	47,5 (36,8 – 68,1)	0,000
	0,27 (0,191 - 0,39)	0,75 (0,37 – 2,09)	0,000003

При морфометрическом исследовании бронхобиоптатов у курящих пациентов с ХОБЛ нами обнаружены аналогичные изменения плотности клеточного инфильтрата собственной пластинки СОБ, за исключением плотности макрофагов (табл. 4).

Таблица 4

Морфометрические показатели состава клеточного инфильтрата и клеток стромы собственной пластинки СОБ у группы сравнения и пациентов с ХОБЛ (на 1 мм² среза), Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})

Исследуемые параметры	Группа сравнения, n=32	ХОБЛ, n=83	p
Суммарная плотность инфильтрата	150,41(47,05-249,60)	276,6(215,37-323,21)	0,001
Макрофаги	50,59 (9,26-87,54)	88,35 (68,50-108,50)	0,003
Лимфоциты	32,89 (12,45-58,80)	37,11 (19,40-49,40)	0,05
Нейтрофилы	59,85 (12,36-104,60)	141,01 (108,3-170,80)	0,001
Фибробласты	177,82 (112,56-226,87)	281,02(163,52-404,16)	0,004

По данным дискриминантного анализа НФ, МФ и межэпителиальным ЛФ бронхов принадлежит ведущая роль в структурной перестройке бронхиальной стенки у курильщиков с ХОБЛ ($\lambda=0,49$, $F=68,94$, $p<0,0001$; $\lambda=0,61$, $F=45,9$, $p<0,0001$; $\lambda=0,38$, $F=84,21$, $p<0,0001$). Вышеуказанные результаты подтверждаются данными литературы, в которых развитие ХОБЛ у курильщиков связывают с клеточным и функциональным дисбалансом между гранулоцитами и МФ, что сопровождается структурными изменениями СОБ, реализующееся в виде увеличения БЭСД в ИМ и БС [Аверьянов А.В., 2007; Rörpcke S., 2012].

По результатам наших исследований у курильщиков с ХОБЛ, по сравнению с курильщиками без ХОБЛ, имеет место статистически значимое снижение количества МФ в ИМ и БС на фоне увеличения их плотности в собственной пластинке СОБ (табл. 2,3,4), что, вероятно, происходит за счет субпопуляции

макрофагов M₂ [William D. Cornwell, 2018]. По данным литературы даже после прекращения курения отмечается лишь частичная поляризация фенотипа МФ в субпопуляции M₂ без изменения баланса про- и противовоспалительных цитокинов [Barnes, P.J., 2004; Kunz L.I., 2011; Niemstra P.S., 2013]. При длительном воздействии табачного дыма у курильщиков с ХОБЛ в СОБ происходит увеличение продолжительности жизни этих клеток за счет высокой концентрации провоспалительных цитокинов, а также снижение защитно-барьерной и фагоцитарной функции МФ, что стимулирует их участие в процессах ремоделирования бронхиальной стенки (непосредственно через продукцию факторов роста TGF- β и FGFs) и подтверждается в нашем исследовании на ультраструктурном уровне появлением МФ с признаками дегенерации и сниженным числом фагосом [Непомнящих Г.И., 2005; Taylor A.E., 2010; Vlahos R., 2010; Berenson C.S., 2013].

При проведении корреляционного анализа были выявлены прямые взаимосвязи между общим числом МФ в ИМ, БС и ОФВ1 (после БД) ($r=0,42$; $p=0,03$) у курильщиков с ХОБЛ, а также обратные - между общим количеством МФ в бронхиальном содержимом и интенсивностью курения (пачка-лет) ($r= -0,61$, $p=0,002$) у «здоровых» курильщиков. Данный факт подтверждает одну из ключевых ролей макрофагов в защите бронхиального дерева от воздействия табачного дыма, а истощение их морфофункционального ресурса, вероятно, может приводить к развитию ХОБЛ.

У курящих пациентов с ХОБЛ обнаружено увеличение плотности ЛФ в собственной пластинке СОБ, в том числе за счет межэпителиальных форм (группа ХОБЛ - 4,81 (2,28-6,25); группа сравнения - 2,15 (0 - 5,00), $p = 0,004$). Согласно данным литературы количество ЛФ в бронхиальной стенке при ХОБЛ увеличивается, преимущественно, за счет субпопуляции CD8⁺-клеток, которые локализуются межэпителиально [Stefano Di. A., 2004; Геренг Е.А., 2012]. Цитотоксическое действие межэпителиальных лимфоцитов (CD8⁺-лимфоцитов) на клетки бронхиального эпителия у курильщиков с ХОБЛ подтверждается большим количеством БЭСД, в которых на ультраструктурном уровне определялись морфологические признаки дегенерации ядра, цитоплазматического матрикса и белок-синтетического аппарата клетки.

Кроме прямого цитотоксического действия на клетки бронхиального эпителия, CD8⁺-лимфоциты продуцируют TNF- α , который усиливает высвобождение ИЛ-8 из нейтрофилов и снижает концентрацию ИЛ-10, что у курящих пациентов сопровождается развитием необратимой бронхиальной обструкции и приводит к формированию ХОБЛ [Barnes P.J., 2009; Damiá Ade D., 2011]. В исследуемой группе больных ХОБЛ это подтверждается данными корреляционного анализа: положительной взаимосвязью между плотностью межэпителиальных лимфоцитов и концентрацией TNF- α в БС и ИМ ($r= 0,66$, $p=0,0027$), а также отрицательными корреляциями между концентрацией TNF- α и ИЛ-10 в БС и ИМ ($r= -0,66$, $p=0,0034$), между концентрацией TNF- α в ИМ и БС и ОФВ1/ФЖЕЛ ($r= -0,58$, $p=0,001$), что свидетельствует о значимой роли лимфоцитов и TNF- α в развитии ХОБЛ. При корреляционном анализе в группе сравнения также выявлена прямая взаимосвязь между концентрацией TNF- α в БС

и ИМ и интенсивностью курения, пачка-лет ($r=0,51$, $p=0,02$). В целом при иммунологическом исследовании было выявлено, что в бронхиальном секрете курильщиков с ХОБЛ ИЛ-8 выше в 120 раз, TNF- α - в 5 раз, TGF- β_1 - в 7 раз, ИНФ- γ - в 5 раз, а ИЛ-10 снижен в 10 раз по сравнению с группой «здоровых» курильщиков. При этом дискриминантный анализ подтверждает значимую роль в развитии ХОБЛ повышенной концентрации TNF- α , ИЛ-8 в ИМ и БС ($\lambda=0,54$; $F=35,20$; $p<0,0001$). Выраженная воспалительная инфильтрация, определяющаяся в СОБ у курильщиков с ХОБЛ, на фоне дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов запускает структурные изменения бронхиальной стенки, которые приобретают автономный характер и заболевание продолжает прогрессировать даже при исключении воздействия внешних факторов, в частности табачного дыма.

Согласно данным S. Isajevs [Isajevs S., 2009] иммунорегуляторное действие TGF- β_1 сопровождается активизацией пула Т-лимфоцитов с ростом их цитотоксического эффекта, а также данный ростовой фактор стимулирует созревание и дифференцировку фибробластов, в том числе выработку ими коллагеновых волокон и основного вещества соединительной ткани, что приводит к развитию фиброза собственной пластинки СОБ с, преимущественно, периваскулярной локализацией и сужением просвета сосудов. В нашей работе было обнаружено как значительное превышение концентрации TGF- β_1 у курильщиков с ХОБЛ в ИМ и БС по сравнению с группой «здоровых» курильщиков (72,43 пг/мл и 9,47 пг/мл соответственно, $p=0,005$), так и увеличение плотности фибробластов (табл. 4) с одновременным повышением объемной плотности соединительной ткани (0,74 мм³/мм³ и 0,69 мм³/мм³, соответственно, $p<0,05$). Преобладание периваскулярной локализации фиброза бронхиальной стенки у данных пациентов по сравнению с группой курильщиков без ХОБЛ отражалось в появлении большого количества капилляров с морфологическими признаками сужения просвета с последующей редукцией микрососудистого русла на микрофотографиях, и подтверждалось данными морфометрии как на светооптическом (УО капилляров 0,09 мм³/мм³ и 0,06 мм³/мм³, соответственно, $p<0,05$), так и на ультраструктурном уровнях (УО капилляров 0,69 (0,36-0,88) мкм³/мкм³ и 0,44 (0,28-0,56 мкм³/мкм³) соответственно, $p=0,004$).

Важно отметить, что в группе пациентов с ХОБЛ по данным корреляционного анализа были выявлены достоверные связи ряда важных клинико-функциональных показателей с выявленными морфологическими, иммунологическими изменениями в СОБ, указанными выше. Нами обнаружены прямые корреляции между длительностью синдрома одышки и концентрацией TGF- β_1 в ИМ и БС ($r=0,46$, $p=0,02$), количеством нейтрофилов в ИМ и БС ($r=0,63$, $p=0,0044$); между частотой обострения заболевания и объемной плотностью соединительной ткани в СОБ ($r=0,47$, $p=0,009$); между интенсивностью курения (пачка-лет) и УО базальных эпителиоцитов ($r=0,71$, $p=0,0021$). А также обратные корреляции между соотношением ОФВ1/ФЖЕЛ и концентрацией TNF- α в ИМ и БС ($r=-0,58$, $p=0,002$); между ОФВ1 (после БД) и плотностью фибробластов ($r=-0,54$, $p=0,002$), УО базальных эпителиоцитов ($r=-0,37$, $p=0,04$); между интенсивностью курения (пачка-лет) и плотностью фибробластов ($r=-0,38$,

$p=0,009$). Полученные нами результаты указывают на значимую роль данных параметров СОБ в процессах эпителиального ремоделирования бронхиальной стенки, что у курильщиков приводит к клиническим проявлениям ХОБЛ.

Дисциркуляторные расстройства, определяющиеся у курящих пациентов с ХОБЛ, проявляются в нарушении ультраструктурной организации капиллярного звена. Обнаруженные нами изменения в капиллярах у курильщиков с ХОБЛ были представлены снижением УО МПВ на люминальной поверхности эндотелиоцитов капилляров собственной пластинки СОБ (0,18 (0,15-0,28) при ХОБЛ; группа сравнения 0,26 (0,18-0,34)) с одновременным уменьшением диаметра гранул Вейбеля – Палладе (429,6 (356,2-500,2) при ХОБЛ; 432,2 (355,6-492,5) группа сравнения). Эти изменения в эндотелиоцитах капилляров легких у пациентов с ХОБЛ, отражают признаки эндотелиальной дисфункции и подтверждаются данными дискриминантного анализа, согласно которым УО МПВ ($\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$) является ведущим патофизиологическим звеном сосудистого ремоделирования, наблюдаемого у пациентов с ХОБЛ при воздействии табачного дыма ($\lambda=0,39$; $F=72,99$; $p<0,0001$). В основной группе было выявлено уменьшение УО капилляров собственной пластинки СОБ и повышении доли сосудов с ультраструктурными признаками реологических расстройств (стаза, сладжа, тромбоза), что нарушает перфузию через микрососуды и приводит к блокаде транскапиллярного обмена [Rodella L.F., 2010; Kubo H., 2014]. Таким образом, у курильщиков с ХОБЛ развитие эндотелиальной дисфункции с последующим изменением сосудов микроциркуляторного русла в бронхиальной стенке вносит значимый вклад в формирование необратимой бронхиальной обструкции и хронической легочной гипертензии. Это подтверждается также положительными корреляциями: между ОФВ1/ФЖЕЛ и УО МПВ ($r=0,78$, $p=0,000143$), УО капилляров, $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ($r=0,51$, $p=0,000126$); между инструментально подтвержденной легочной гипертензией и плотностью соединительной ткани в собственной пластинке СОБ ($r=0,51$, $p=0,012$).

Морфофункциональное изменение клеток стромы, а также сосудистое ремоделирование бронхиальной стенки у курящих пациентов с ХОБЛ приводит к выраженной структурной дезорганизации эпителия, проявляющейся плоскоклеточной метаплазией, атрофией реснитчатых эпителиоцитов, бокаловидноклеточной гипоплазией (соотношение к реснитчатым эпителиоцитам 1:6, 1:7). Изменение процессов слизиобразования у курильщиков с ХОБЛ проявлялось уплотнением, полиморфизмом и осмиофилией секреторных гранул в бокаловидных клетках в сочетании с расширением ЭПС и снижением УО митохондрий, что приводило к нарушению процессов экстррузии слизи, реализующихся в том числе и в низких показателях отношения ОФВ1/ФЖЕЛ. Данные патоморфологические изменения подтверждаются отрицательной корреляцией ОФВ1/ФЖЕЛ с УО ЭПС в бокаловидных экзокриноцитах ($r=-0,78$, $p=0,005$).

В литературе встречается небольшое количество исследований, направленных на сравнительную ультраструктурную характеристику бронхиальной стенки у курильщиков с ХОБЛ и у курильщиков, устойчивых к развитию заболевания. В последнее время ряд исследований обращены в сторону

выяснения роли митохондриальной дисфункции при развитии ХОБЛ у курильщиков. В исследованиях Hoffmann R.F, Nara H. и др. было показано, что длительное воздействие сигаретного дыма вызывает устойчивые структурные изменения в этих органеллах, отражающиеся в фрагментации, ветвлении и изменении количества крист, разрушении митохондриальной ДНК, ее мембранных липидов и белков, что блокирует систему окислительного фосфорилирования у пациентов с ХОБЛ [Soulitzis N., 2012; Aravamudan V., 2013; Hoffmann R.F., 2013; Nara H., 2013]. При ультраструктурном исследовании бронхиальных эпителиоцитов у курящих пациентов с ХОБЛ нами обнаружены признаки митохондриальной дисфункции - появление гетерогенных популяций митохондрий с уплотнением и просветлением митохондриального матрикса, что подтверждается данными морфометрического исследования: в бокаловидных и базальных эпителиоцитах определялось снижение УО митохондрий с одновременным увеличением УО ЭПС в сравнении со «здоровыми» курильщиками. Полученные результаты в отношении ЭПС могут отражать как повышенную белок-синтетическую функцию в этих клетках, так и являться признаками нарушения сложного гомеостатического механизма, известного как «ответ на мисфолдинг» (unfolded protein response, UPR).

По данным литературы для формирования нормальной белок-синтетической функции в клетках эпителия бронхов необходимо правильное взаимодействие между белок-синтетической нагрузкой, функциональной активностью, а также «вместимостью» ЭПС. Результатом нарушения этого баланса, признаки которого наблюдаются в нашем исследовании у пациентов с ХОБЛ, является функциональная «перегрузка» ретикулула, мисфолдинг и аккумуляция в его просвете неактивных, агрессивных белков, а при прогрессировании процесса – гибель клетки [Comandini A., 2010; Cantin A.M., 2012; Barreiro E, 2019]. Основное назначение «ответа на мисфолдинг» (UPR) является компенсация стресса ЭПС, восстановление гомеостаза [Дедов И.И., 2012; Kelsen S.G., 2016]. По данным Ribeiro C. M. и др. под воздействием табачного дыма происходит расширение и вакуолизация ЭПС с формированием круглых электронно-плотных конгломератов в бокаловидных и базальных клетках [Ribeiro C.M., 2012]. Подобные проявления стресса ЭПС подтверждаются нашими данными электронно-микроскопического исследования. Можно предположить, что постоянно курящие пациенты, у которых развивается ХОБЛ, имеют определенные дефекты системы «ответа на мисфолдинг» (UPR) и Nrf2 – сигнального пути, что требует дальнейшего исследования.

Несмотря на достаточно универсальные механизмы развития митохондриальной дисфункции и стресса ЭПС, возможно, именно эти звенья патогенеза могут быть базовыми и пусковыми в развитии ХОБЛ. И наоборот, эффективная реакция системы «ответа на мисфолдинг» и компенсаторные возможности митохондриального и белок-синтетического аппаратов клетки, возможно, лежат в основе резистентности к развитию ХОБЛ даже при длительном воздействии табачного дыма.

У курящих лиц без ХОБЛ это предположение подтверждалось данными морфометрического исследования бокаловидных и базальных эпителиоцитов

СОБ, в цитоплазме которых определяется одновременное увеличение УО и ЭПС, и митохондрий, и прямыми корреляциями между исследуемыми параметрами ($r=0,59$, $p=0,0002$ и $r=0,78$, $p=0,0012$, соответственно). Учитывая, что у данной группы пациентов ХОБЛ не развилась даже при длительном воздействии табачного дыма, данный факт свидетельствует о том, что расширение ЭПС происходит в рамках именно адаптивной реакции на повышенную белоксинтезирующую нагрузку с сохранением нормальной функции энергетического аппарата клетки при отсутствии необратимых структурных изменений митохондрий и развития стойкой митохондриальной дисфункции. Кроме того, выявленная обратная корреляция между УО ЭПС в бокаловидных эпителиоцитах и плотностью макрофагов в собственной пластинке СОБ свидетельствует о прямой роли макрофагов в формировании адаптивной реакции к табачному дыму ($r=-0,63$, $p=0,0028$).

В тоже время, у курильщиков с ХОБЛ по сравнению с группой «здоровых» курильщиков в эпителиальных клетках СОБ нами обнаруживались морфологические маркеры, отражающие истощение белок-синтетического и энергетического аппаратов клеток, что предположительно может влиять на функциональную активность шаперонов ЭПС, и в свою очередь усиливает его стресс и ведет к срыву UPR, расширению и необратимой перегрузке ЭПС с последующей гибелью клетки. Данные морфофункциональные изменения подтверждаются результатами корреляционного анализа: в отличие от группы сравнения у курильщиков с ХОБЛ были выявлены обратные взаимосвязи между УО ЭПС и УО митохондрий в бокаловидных и в базальных эпителиоцитах ($r=-0,64$, $p=0,0011$ и $r=-0,72$, $p=0,0082$, соответственно). Таким образом, морфологические признаки регенераторно-пластического и энергетического дефицита, срыва процесса UPR не только подтверждались данными дискриминантного анализа УО митохондрий и ЭПС в бокаловидных и базальных эпителиоцитах ($\lambda=0,31$; $F=74,92$; $p<0,0001$ и $\lambda=0,62$; $F=41,18$; $p<0,0001$, соответственно), но и была показана связь данных изменений со снижением спирометрических показателей (обратная корреляция между ОФВ1/ФЖЕЛ и УО ЭПС в бокаловидных эпителиоцитах, $r=-0,78$, $p=0,005$).

Кроме того, при внутригрупповом анализе курильщиков с ХОБЛ было показано усугубление ультраструктурных изменений ЭПС при более тяжелых формах заболевания на фоне изменения таких морфометрических признаков ремоделирования бронхиальной стенки, как УО базальных эпителиоцитов и УО покровного эпителия (табл. 5).

Таблица 5

Результаты внутригруппового анализа пациентов с ХОБЛ в отношении основных маркеров формирования заболевания

Маркеры развития ХОБЛ	Показатели маркеров развития ХОБЛ		Уровень значимости и различий
	Курильщики с ХОБЛ (ОФВ1 менее 50%), n=53	Курильщики с ХОБЛ (ОФВ1 более 50%), n=30	
УО покровного эпителия ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$)	0,26 (0,20-0,36)	0,2 (0,18-0,25)	0,036
УО базальных эпителиоцитов,	0,06 (0,05-0,08)	0,04 (0,02-0,06)	0,0037

(мм ³ /мм ³)			
УО ЭПС в базальных эпителиоцитах, (мкм ³ /мкм ³)	0,1 (0,08 – 0,12)	0,09 (0,07 – 0,11)	0,0127
УО ЭПС в бокаловидных эпителиоцитах, (мкм ³ /мкм ³)	0,1 (0,07 – 0,12)	0,08 (0,06- 0,12)	0,015

Примечание: *n* – количество пациентов; *p* – статистическая значимость различий;

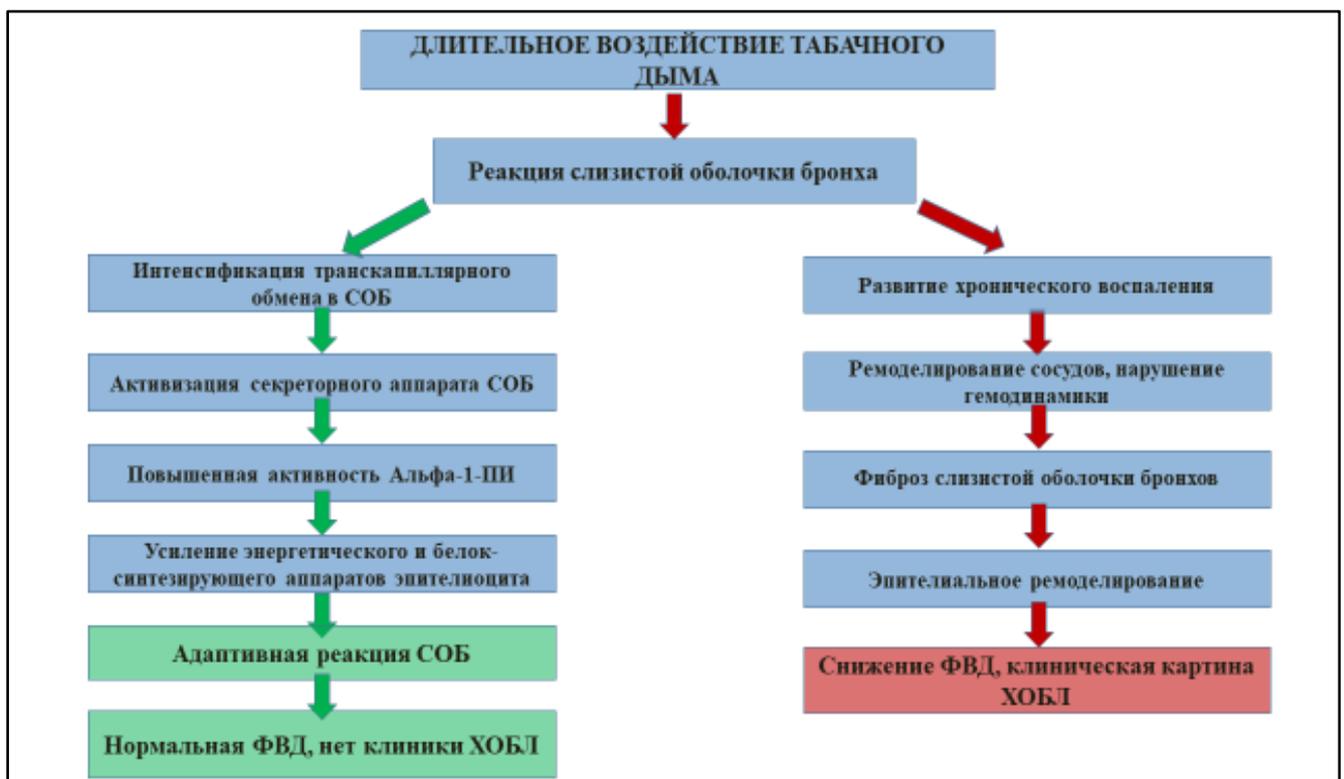
Результаты внутригруппового анализа еще раз подтверждают значимую роль изменений со стороны ЭПС под воздействием табачного дыма, в том числе нарушение функционирования «ответа на мисфолдинг» (UPR), не только при развитии ХОБЛ, но и при прогрессировании заболевания.

КОНЦЕПЦИЯ РАБОТЫ

Таким образом, обнаруженные нами тканевые, клеточные и молекулярные взаимодействия в бронхиальной стенке у курящих пациентов без признаков ХОБЛ носят адаптивно-приспособительный характер, направленный на усиление белок-синтетических и энергетических процессов в эпителиальных клетках, а также на снижение функциональной активности клеток воспалительного инфильтрата. У курящих пациентов с ХОБЛ в бронхиальной стенке обнаружены признаки ремоделирования, которые реализуются в структурных перестройках клеток эпителия бронхов, изменения функционирования клеток стромы, морфологических признаках нарушения гемодинамики, что сопровождается формированием эпителиально-стромальной и эндотелиальной дисфункции, а также ультраструктурные признаки дезадаптивных нарушений белок-синтезирующего и энергетического аппаратов клетки (рис. 1). При этом была показана достоверная связь ряда ключевых биохимических, иммунологических, морфологических маркеров развития заболевания с клиническими критериями постановки диагноза ХОБЛ.

Рисунок 1

Концепция работы



ВЫВОДЫ

1. У курильщиков без ХОБЛ сохраняется типичное строение слизистой оболочки бронхов при минимальных воспалительных и дистрофических изменениях в реснитчатых эпителиоцитах на фоне гиперплазии бокаловидных клеток и белково-слизистых желез бронхов. У курильщиков с ХОБЛ регистрируются признаки как сосудистого, так и эпителиального ремоделирования, приводящие к нарушению гемодинамики, фиброзу собственной пластинки СОБ, атрофии и плоскоклеточной метаплазии эпителиальной выстилки бронхов.

2. При электронно-микроскопическом исследовании бронхобиоптатов у курильщиков без ХОБЛ определяются ультраструктурные признаки активации пластического и энергетического аппаратов в базальных и бокаловидных эпителиоцитах, усиление секреторных процессов в бокаловидных клетках, стимуляция транскапиллярного транспорта в собственной пластинке СОБ. У курильщиков с ХОБЛ в бронхиальной стенке обнаруживаются морфологические признаки эндотелиальной дисфункции, снижение транскапиллярного обмена, ассоциированные с истощением структурно-метаболических резервов и регенераторно-пластической недостаточностью бронхиальных клеток.

3. У курильщиков без ХОБЛ регистрируется адаптивная реакция структур бронхиальной стенки, сопровождающаяся незначительным повышением в бронхиальном секрете общего количества нейтрофилов с сохранением нормального числа макрофагов, более высокой ферментативной активностью α 1-ПИ. У курильщиков с ХОБЛ на фоне выраженного нейтрофильного воспаления с уменьшением общего числа макрофагов и появлением большего количества бронхиальных эпителиоцитов с признаками дистрофии определяется повышение в бронхиальной слизи ИЛ-8 в 120 раз, TNF- α в 5 раз, TGF- β 1 в 7 раз, сочетающееся с дисбалансом в системе протеаз-антипротеаз.

4. Ведущими тканевыми, клеточными и молекулярными маркерами резистентности у курильщиков к развитию ХОБЛ являются: сохранение нормальной объемной плотности покровного эпителия, повышение количества макрофагов при отсутствии значительного увеличения числа нейтрофилов, концентрации TNF- α и TGF- β 1 в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте, сохранение нормального удельного объема эндоплазматической сети и митохондрий в эпителиальных клетках слизистой оболочки бронхов на фоне увеличения удельного объема микропиноцитозных везикул в эндотелиоцитах капилляров бронхиальной стенки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Цитологическое, биохимическое и иммунологическое исследование индуцированной мокроты можно рекомендовать как скрининговый неинвазивный тест для формирования групп высокого риска развития ХОБЛ.

2. Определение количества МФ, НФ, бронхиального эпителия обычного строения, активности эластазы и α 1-протеиназного ингибитора, а также TGF- β 1, ИЛ-8, TNF- α в бронхиальных смывах можно использовать как ведущие маркеры для прицельной ранней диагностики ХОБЛ.

3. При прогнозировании высокого риска развития ХОБЛ у курильщиков с нормальной функцией внешнего дыхания целесообразно проводить бронхиобиопсию с морфологическим анализом гистологического материала.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Морфометрическая характеристика сосудов микроциркуляторного русла бронхиального дерева у курящих лиц, страдающих и не страдающих хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / Кремис И.С., Букреева Е.Б., Геренг Е.А., Боярко В.В., Буланова А.А., Зенгер Г.В. // **Сибирский медицинский журнал.** - 2018.- Т. 33, №1. - С. 79 – 85. (0,355)

2. Морфометрическая характеристика бронхиального дерева у курильщиков, страдающих и не страдающих хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / Кремис И.С., Букреева Е.Б., Геренг Е.А. // **Терапевтический архив.** - 2016.- Т. 88, № 3. - С. 18-23. (0,832)

3. Особенности слизистой оболочки бронхов у курильщиков с хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И., Букреева Е.Б., Кремис И.С.// **Пульмонология.** – 2015. - №3. – С. 357-362. (0,758)

4. Роль трансформирующего фактора роста β в структурных изменениях бронхиальной стенки при различных вариантах воспаления в бронхах [Текст] / Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И., Огородова Л.М., Мильто И.В., Букреева Е.Б., Кобякова О.С., Селиванова П.А., Кремис И.С. // **Сибирский научный медицинский журнал.** - 2012. - Т. 32, № 5. - С. 28-32. (0,363)

5. Клеточное звено и цитокиновый профиль лаважной жидкости при тяжелых формах бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких [Текст] / Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И., Огородова Л.М., Букреева Е.Б., Селиванова П.А., Дзюман А.Н., Кремис И.С., Еремина Т.А. // **Медицина в Кузбассе.** - 2011. - № 1. - С. 4-9. (0,228)

6. Сравнительная ультраструктурная характеристика слизистой оболочки бронхов при различных типах воспаления дыхательных путей [Текст] / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, Л.М. Огородова, Е.Б. Букреева, П.А. Селиванова, А.Н. Дзюман, И.С. Кремис // **Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.** – 2011. – Т. 37, № 1. – С. 70–73. (0,324)

7. Ассоциация полиморфных вариантов генов цитокинов (TNF и IL8) с развитием хронической обструктивной болезни легких [Текст] / Сеитова Г.Н., Букреева Е.Б., Кремис И.С., Пузырёв В.П. // **Бюллетень сибирской медицины.** - 2010. - Т. 9, № 3. - С. 91-97. (0,392)

8. Анализ взаимосвязи полиморфизмов генов TNF и IL8 с формированием клинических особенностей хронической обструктивной болезни легких [Текст] / Сеитова Г.Н., Букреева Е.Б., Кремис И.С., Пузырёв В.П. // **Бюллетень сибирской медицины.** - 2010. - Т. 9, № 5. - С. 88-92. (0,392)

9. Морфологические маркеры ремоделирования слизистой оболочки бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких [Текст] // Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И., Огородова Л.М., Букреева Е.Б., Селиванова П.А., Дзюман А.Н., Кремис И.С., Еремина Т.А. // **Пульмонология.** - 2009. - № 4, С. 64-68. (0,758)

10. Морфологические и биохимические маркеры воспалительных реакций в слизистой оболочке бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких [Текст] / Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И., Огородова Л.М., Акбашева О.Е., Букреева Е.Б., Дзюман А.Н., Кобякова О.С., Селиванова П.А., Кремис И.С. // **Бюллетень сибирской медицины.** - 2009. - Т. 8, № 3. - С. 11-16. (0,392)

11. Структурно-функциональные изменения в слизистой оболочке бронхов при хронических воспалительных заболеваниях [Текст] / Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И., Огородова Л.М., Букреева Е.Б., Козина О.В., Селиванова П.А., Дзюман А.Н., Кремис И.С. // **Сибирский научный медицинский журнал.** - 2009. - Т. 29, № 5. - С. 35-39. (0,363)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
ИМ – индуцированная мокрота
БС – бронхиальные смывы
БЭСД – бронхиальные эпителиоциты с признаками дистрофии
ИМ – индуцированная мокрота
МПВ – микропиноцитозные везикулы
СОБ – слизистая оболочка бронхов
УО – удельный объем
ЭПС – эндоплазматическая сеть
TNF- α – фактор некроза опухоли α
НФ – нейтрофилы
МФ – макрофаги
ЭФ – эозинофиллы
ЛФ – лимфоциты
ФВД – функция внешнего дыхания
 α 1-ПИ – альфа-1 протеиназный ингибитор
IL – интерлейкин
INF- γ – интерферон- γ
TGF- β ₁ – трансформирующий фактор роста β ₁
UPR – unfolded protein response, «ответ на мисфолдинг»

Тираж 100 экз. Заказ №.
Томский государственный университет
систем управления и радиоэлектроники
634050, г. Томск, пр. Ленина, 40.
Тел.: (3800) 533018.