

На правах рукописи



ГЕРЕНГ ЕЛЕНА АНДРЕЕВНА

**РОЛЬ ТКАНЕВЫХ, КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ
ВОСПАЛЕНИЯ БРОНХИАЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
14.01.25 – пульмонология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор
Суходоло Ирина Владимировна

доктор медицинских наук, профессор
Букреева Екатерина Борисовна

Официальные оппоненты:

***Пуликов
Анатолий Степанович***

доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией функциональной морфологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

***Солонский
Анатолий Владимирович***

доктор медицинских наук, заведующий лабораторией нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

***Черногорюк
Георгий Эдинович***

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Защита состоится «31» мая 2012 года в 9 00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (634050, г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета.

Автореферат разослан «24» апреля 2012 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Герасимов А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность проблемы

Функциональная морфология воздухоносных путей и легких в норме и при ряде патологических состояний изучена весьма детально (Кузьмин А.З., 2007; Непомнящих Г.И., 1990, 1997, 2005; Чучалин А.Г., 2000; Непомнящих Д.Л., 2010; Chung K.F., 2000; Majo J., 2001; Davies D.E., 2003). Оценка изменений, развивающихся в бронхо-легочной системе при том или ином патологическом процессе, служит основой для понимания закономерностей компенсаторно-приспособительных реакций в органах дыхания (Непомнящих Г.И., 2005; Непомнящих Д.Л., 2010).

Воспаление дыхательных путей, спровоцированное инфекцией, травмой или действием аллергенов, приводит к характерным патоморфологическим и клиническим проявлениям бронхолегочных заболеваний, среди которых 15–25 % приходится на тяжелую бронхиальную астму (БА) и тяжелую стадию хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), сопровождающиеся высокой частотой жизнеугрожающих обострений и смертностью пациентов (Огородова Л.М., 2001; Волкова Л.И., 2003; Княжевская Н.П., 2003; Шапорова Н.Л., 2003; Чучалин А.Г., 2004, 2010; Авдеев С.Н., 2007; Черняев А.Л., 2007; Smith H., 2002; Eder W., 2006; Holgate S.T., 2006; Barnes P.J., 2007; Wenzel S.E., 2009; Redington A.E., 2010).

Тяжелая бронхиальная астма и тяжелая стадия хронической обструктивной болезни легких являются важными медико-социальными проблемами, так как на их долю приходится 80 % всех затрат, связанных с заболеваниями бронхолегочной системы, – это как прямые затраты на медикаментозное обеспечение, оказание дорогостоящей экстренной помощи, так и не прямые затраты, обусловленные длительными периодами нетрудоспособности пациентов (Черняев А.Л., 1998; Огородова Л.М., 2001; Чучалин А.Г., 2004).

По результатам проведенных в последние годы эпидемиологических исследований (AIRE, AIRCEE, AIA, НАБАТ) контроль над заболеванием у пациентов с тяжелой бронхиальной астмой регистрируется лишь у 5–20 % больных, что связано в первую очередь с неадекватным степени ее тяжести лечением. В зависимости от чувствительности к терапии астму разделяют на чувствительную и резистентную. К последней относят астму тяжелого течения, характеризующуюся недостаточным контролем, несмотря на применение адекватных доз ингаляционных кортикостероидов.

Терапевтически резистентная бронхиальная астма отличается выраженным полиморфизмом: к ней относятся фенотипы «brittle» (нестабильная форма) и «астма с фиксированной бронхообструкцией»

(гормонозависимая) (Кобякова О.С., 2005; Огородова Л.М., 2005; Holgate S.T., 2004; Barnes P.J., 2007; Wenzel S.E., 2009).

Клиницисты нередко сталкиваются с проблемой дифференциальной диагностики тяжелых форм бронхиальной астмы и тяжелой стадии хронической обструктивной болезни легких. До настоящего времени четко не определены морфологические предикторы развития тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмы, а также не разработаны дифференциальные критерии патоморфоза тяжелой астмы и тяжелой стадии хронической обструктивной болезни легких.

Единственным способом получения достоверной информации о морфофункциональном состоянии бронхиального дерева являются бронхоскопические методы исследования, хотя эти манипуляции инвазивны и могут спровоцировать утяжеление состояния пациентов (Виггинс Дж., 1991; Непомнящих Г.И., 2005; Davies D.E., 2003; Boulet L.P., 2008). В этой связи заслуживает внимания возможность анализа индуцированной мокроты и бронхиальных смывов, клеточный и молекулярный состав которых, по видимому, отражает состояние бронхиального дерева (Авдеев С.Н., 1998; Цой А.Н., 2007; Rutgers S.R., 2000; Hudy M.H., 2010).

Морфофункциональные изменения в органах дыхания, выявленные при анализе биоптатов слизистой оболочки бронхов, в сопоставлении с исследованием бронхиальных смывов и индуцированной мокроты могут служить базисом для определения тканевых, клеточных и молекулярных предикторов тяжелого течения бронхиальной астмы, а также дифференциальных критериев между бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких.

Цель работы

Цель диссертационной работы – выявить ведущие тканевые, клеточные и молекулярные взаимодействия в воздухоносных путях при бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких.

Задачи исследования

1. Изучить морфофункциональные особенности слизистой оболочки бронхов у пациентов с тяжелой терапевтически чувствительной и терапевтически резистентной бронхиальной астмой.

2. Оценить состояние тканевых, клеточных и молекулярных компонентов бронхиальной стенки и сопоставить их с клиникофункциональными параметрами у больных терапевтически резистентной бронхиальной астмой фенотипа «brittle» (нестабильная астма).

3. На основании диагностики функций внешнего дыхания, гистологического, иммуногистохимического, ультраструктурного анализа

бронхиобиоптатов, цитологического, иммунологического и биохимического исследования бронхиальных смывов и индуцированной мокроты выявить тканевые, клеточные и молекулярные механизмы, характерные для терапевтически резистентной бронхиальной астмы фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» (гормонозависимая).

4. Дать морфофункциональную характеристику бронхиобиоптатов, бронхиальных смывов и индуцированной мокроты при тяжелой стадии хронической обструктивной болезни легких.

5. Выявить тканевые, клеточные и молекулярные маркеры, отличающие тяжелую бронхиальную астму от тяжелой стадии хронической обструктивной болезни легких.

Научная новизна

Проведено комплексное морфологическое исследование биоптатов слизистой оболочки бронхов, бронхиальных смывов и индуцированной мокроты при тяжелой бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких.

Впервые показано, что резистентная к терапии бронхиальная астма сопровождается более высокой концентрацией оксида азота в бронхиальном содержимом на фоне повышения функциональной активности тучных клеток и слизиобразующей функции бокаловидных экзокриноцитов в слизистой оболочке бронхов.

Получены новые данные, играющие ключевую роль при разделении тяжелой терапевтически резистентной астмы на фенотипы «brittle» и «астма с фиксированной бронхообструкцией», – это усиление экспрессии рецепторов к трансформирующему фактору роста β_1 на клетках бронхиального эпителия, возрастание удельного объема митохондрий и лизосом в реснитчатых эпителиоцитах, увеличение доли «светлых» и «темных» эндотелиоцитов капилляров слизистой оболочки бронхов, а также снижение концентрации интерлейкина-10 в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте.

Впервые продемонстрировано, что высота эпителиального пласта и толщина базальной мембраны, плотность распределения CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов, удельный объем капилляров закрытого типа, а также концентрация трансформирующего фактора роста β_1 , активность эластазы в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте являются наиболее информативными показателями при дифференциальной диагностике бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких.

Впервые обнаружено, что тканевые изменения слизистой оболочки бронхов коррелируют с морфологическими параметрами и функциональными

особенностями клеток воспалительного инфильтрата, концентрацией иммунорегуляторных молекул, цитокинов и ростовых факторов в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте, а также с клинико-функциональными тестами, отражающими выраженность бронхообструктивного синдрома при тяжелой бронхиальной астме и тяжелой стадии хронической обструктивной болезни легких.

Впервые установлены положительные взаимосвязи между плотностью распределения макрофагов и дегранулированных эозинофилов в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов, выраженностью экспрессии мРНК генов M_3 -холинорецептора, H_1 -рецептора на этих клетках, концентрацией интерлейкина-4 в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте, а также показателями PK_{20} (предельной концентрацией метахолина, вызывающей падение объема форсированного выдоха на 20 % за 1 секунду) при бронхиальной астме фенотипа «brittle» (нестабильная форма).

Толщина базальной мембраны эпителиальной выстилки бронхов, концентрация трансформирующего фактора роста β_1 в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте у пациентов с астмой с фиксированной бронхообструкцией (гормонозависимой) положительно коррелировала как с длительностью болезни, так и с параметрами суточной лабильности бронхов.

Выявлены отрицательные корреляции между плотностью распределения фибробластов, межэпителиальных нейтрофилов и $CD8^+$ -лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов, концентрацией фактора некроза опухоли α в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте, а также индексом Тиффно (отношением объема форсированного выдоха за 1 секунду к жизненной емкости легких) при тяжелой стадии хронической обструктивной болезни легких.

Практическая значимость работы

Определение концентрации интерлейкина-4, трансформирующего фактора роста β_1 , активности эластазы и α_1 -протеиназного ингибитора в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте можно использовать для дифференциальной диагностики тяжелой бронхиальной астмы и тяжелой стадии хронической обструктивной болезни легких. Абсолютное число $CD3^+$ -, $CD4^+$ -лимфоцитов, концентрация интерлейкина-8, 10 в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте являются значимыми маркерами при разделении тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмы на фенотипы «brittle» (нестабильная) и «астма с фиксированной бронхообструкцией» (гормонозависимая).

Множественные корреляции между концентрацией про- и противовоспалительных цитокинов, трансформирующего фактора роста β_1 , а также

активностью эластазы и α_1 -протеиназного ингибитора в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте позволяют рекомендовать индуцированное мокротоотделение как неинвазивный тест для идентификации варианта, выраженности и активности воспалительного процесса в дыхательных путях.

Результаты работы могут быть использованы в педагогическом процессе на кафедрах морфологии, гистологии, патологической анатомии и патологической физиологии, а также в аллергологических и пульмонологических отделениях функциональной диагностики научно-исследовательских институтов и учреждений практического здравоохранения.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедрах морфологии и общей патологии, патологической анатомии, фундаментальных основ клинической медицины, госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

Положения, выносимые на защиту

1. К ведущим морфологическим признакам, определяющим резистентность к проводимой терапии у пациентов с тяжелой бронхиальной астмой, относятся усиленная дегрануляция тучных клеток в слизистой оболочке бронхов, сочетающаяся с гипертрофией бокаловидных экзокриноцитов, уплотнением в них секреторных везикул и расширением цистерн эндоплазматического ретикулума.

2. Тяжелая терапевтически резистентная бронхиальная астма фенотипа «brittle» (нестабильная) по тканевым, клеточным и молекулярным признакам отличается от тяжелой терапевтически резистентной бронхиальной астмы фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» (гормонозависимая).

3. Ультраструктурные признаки регенераторно-пластической недостаточности эпителиоцитов бронхиальной стенки, периваскулярный фиброз, увеличение плотности распределения CD8⁺-цитотоксических клеток, а также эндотелиальная дисфункция капилляров слизистой оболочки бронхов ассоциированы с тяжелой стадией хронической обструктивной болезни легких.

4. Тяжелая бронхиальная астма и тяжелая стадия хронической обструктивной болезни легких формируют характерные для каждой нозологии патоморфологические признаки, которые могут идентифицироваться при исследовании бронхиальных смывов и индуцированной мокроты.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и представлены на Межрегиональной конференции, посвященной 100-летию С.П. Карпова (Томск, 2003), Европейском респираторном конгрессе (Австрия, Вена, 2003; Швеция,

Стокгольм, 2007), всероссийской конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии, гистогенез и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2004), межрегиональной конференции «Клинико-морфологические аспекты общепатологических процессов при социально значимых заболеваниях» (Новосибирск, 2004), V, VIII, X международных конгрессах молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2004, 2007, 2009), всероссийской конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2007), VIII, IX международных конгрессах «Здоровье и образование XXI века» (Москва, 2007, 2008), международной гистологической конференции «Морфогенезы в эволюции, индивидуальном развитии и в эксперименте» (Тюмень, 2008), межрегиональной конференции «Актуальные проблемы медицины» (Абакан, 2008), IX, X конгрессах Международной ассоциации морфологов (Бухара, 2008; Ярославль, 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), заседании экспертной комиссии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (Томск, 2012).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 40 работ, в том числе 22 полнотекстовые статьи в журналах из перечня ВАК РФ, 2 работы в зарубежной печати, 1 монография.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 344 страницах машинописного текста, иллюстрирована 132 рисунками и 52 таблицами, содержит введение, обзор литературы, описание материала и методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы и практические рекомендации. Список использованной литературы содержит 332 источника, из них 110 отечественных и 222 иностранных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Дизайн исследования. Объект исследования

Проведено одномоментное сравнительное нерандомизированное исследование пациентов с БА (n=122) и ХОБЛ (n=85), находившихся на госпитализации в аллергологических и пульмонологических отделениях областной клинической больницы (курировались канд. мед. наук Селивановой П.А.), городской больницы № 3 (наблюдались аспирантом

Кремисом И.С.), НИИ онкологии СО РАМН (велись д-ром мед. наук Черемисиной О.В.) г. Томска (пациенты с БА проконсультированы д-ром мед. наук, профессором, чл.-кор. РАМН Огородовой Л.М., с ХОБЛ – д-ром мед. наук, профессором Букреевой Е.Б.) и в терапевтическом отделении краевой больницы г. Петропавловска-Камчатского (курировались д-ром мед. наук, профессором Козиной О.В.).

Материал набирали в период с 2003 по 2011 годы. Весь материал анализировался лично автором. Диагноз и степень тяжести БА верифицировали согласно критериям глобальной стратегии диагностики, профилактики и лечения астмы (GINA, 2008), ХОБЛ – на основании GOLD, 2008.

Контрольную группу составили биоптаты слизистой оболочки бронхов 10 некурящих доноров-добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными пациентами.

Критерии включения пациентов с БА:

- 1) мужчины (7,3 %) и женщины (92,7 %) в возрасте от 25 до 65 лет;
- 2) стаж заболевания не менее 2 лет;
- 3) амбулаторные и стационарные пациенты;
- 4) положительные аллергопробы с одним и более аэроаллергеном;
- 5) содержание сывороточного Ig E более 100 МЕ/мл;
- 6) при тяжелой БА:

– наличие у больного чувствительной БА: на фоне базисной терапии в дозах более 750 мкг/сут по беклометазону сохранялись ежедневные симптомы болезни, частые ночные приступы, значительное ограничение физической активности, при этом объем форсированного выдоха за 1 секунду или пиковая скорость выдоха ≤ 60 % от должного, вариабельность пиковой скорости выдоха или объем форсированного выдоха за 1 секунду более 30 %;

– наличие у больного БА фенотипа «brittle» (нестабильного), подтвержденного медицинскими документами (диагноз лабильной астмы должен быть подтвержден не ранее чем за 1 год до включения больного в исследование): наличие суточной вариабельности уровня пиковой скорости выдоха с амплитудой > 40 % в течение более 50 % времени за 5-месячный период на фоне максимально интенсивного лечения с применением высоких доз ингаляционных стероидов (прием беклометазона в суточной дозе ≥ 1500 мкг/сут, или будесонида ≥ 1000 мкг/сут, или флутиказона пропионата ≥ 750 мкг/сут), частых ингаляций бронхолитиков;

– наличие у больного фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» (гормонозависимая): постоянная персистенция симптомов БА, низкие показатели функции внешнего дыхания (объем форсированного выдоха за 1 секунду < 60 % от должного, пиковая скорость выдоха < 60 % от

должного) с эпизодами (или без) внезапного ухудшения, требующими системной терапии глюкокортикостероидами (в дозах 5–20 мг/сут по преднизолону в течение не менее 1 года), которая приводит к неполному ответу;

7) при среднетяжелой астме: на фоне базисной терапии в дозах 500–750 мкг/сут по беклометазону (ступень 3 по GINA, 2008) симптомы соответствуют легкой персистирующей БА;

8) отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних 4 недель перед исследованием;

9) умение правильно пользоваться ингалятором, пикфлоуметром, способность адекватно оценивать свое состояние.

Распределение пациентов на исследуемые группы в зависимости от формы БА представлено на рис. 1.

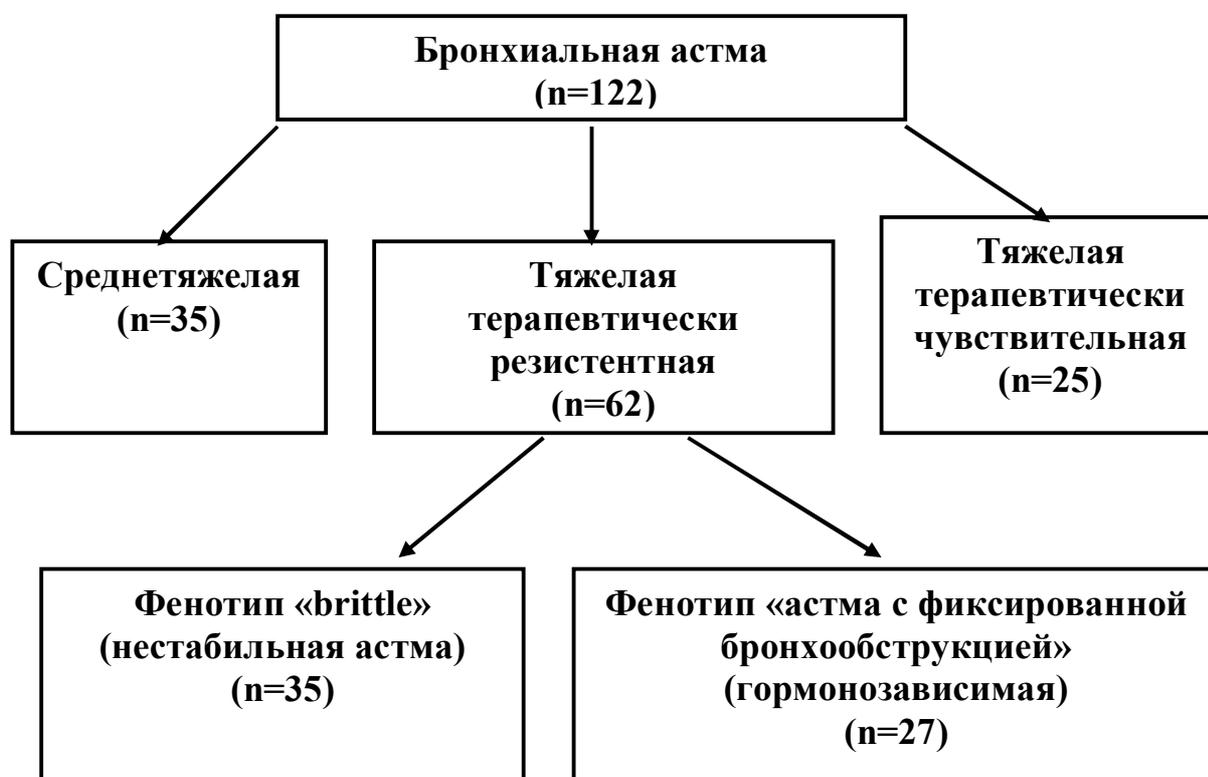


Рисунок 1. Количественная характеристика пациентов с БА, включенных в исследование

Критерии включения пациентов с ХОБЛ:

- 1) мужчины (97,6 %) и женщины (2,4 %) в возрасте от 35 до 65 лет включительно;
- 2) ранее подтвержденный диагноз ХОБЛ (не менее 2 лет);
- 3) амбулаторные и стационарные пациенты;
- 4) длительный кашлевой анамнез, утреннее откашливание мокроты;
- 5) прогрессирующая одышка;

б) постбронходилатационное значение индекса Тиффно (отношение объема форсированного выдоха за 1 секунду к форсированной жизненной емкости легких) $< 70\%$;

наличие эмфиземы легких.

Распределение пациентов в зависимости от стадии ХОБЛ представлено на рис. 2.

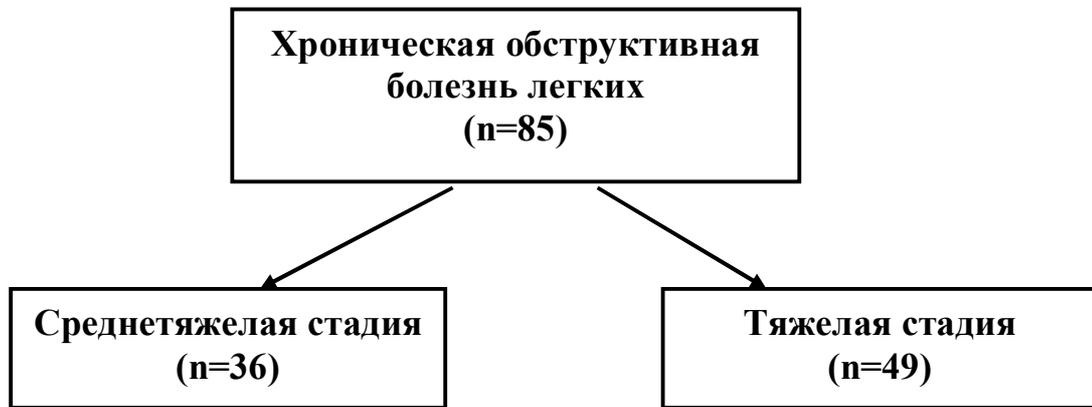


Рисунок 2. Количественная характеристика пациентов с ХОБЛ, включенных в исследование

Критерии включения в контрольную группу:

- 1) отрицательные алергопробы;
- 2) иммуноглобулин E < 80 МЕ/мл;
- 3) отсутствие аллергических заболеваний на момент включения и в анамнезе;
- 4) отсутствие симптомов острых и хронических заболеваний внутренних органов.

Критерии исключения из исследования:

- 1) нежелание пациента принимать участие в исследовании, отсутствие информированного согласия;
- 2) несоблюдение требований исследования – неадекватно выполняемый тест на определение функций внешнего дыхания и бронхиальной гиперреактивности с гистамином, несоблюдение фармакотерапевтического режима, неявка в назначенное врачом-исследователем время;
- 3) наличие других заболеваний бронхолегочной системы – дефицит α_1 -протеиназного ингибитора, бронхоэктатическая болезнь, буллезная эмфизема легких, кисты легких, асбестоз, резекция части легких или их трансплантация;
- 4) нежелательные лекарственные явления;
- 5) участие пациента в других исследованиях;
- 6) наличие психических расстройств, прием психотропных препаратов;

7) наличие тяжелой сопутствующей патологии в стадии декомпенсации, которая, по мнению исследователя, может повлиять на результаты.

Этапы работы выполнялись в г. Томске на кафедрах морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития РФ (зав. каф. д-р мед. наук, профессор Суходоло И.В.); биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития РФ (зав. каф. д-р мед. наук, профессор Серебров В.Ю.); факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития РФ (зав. каф. д-р мед. наук, профессор, чл.-кор. РАМН Л.М. Огородова); в Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития РФ (зав. лаб. д-р мед. наук, профессор Байков А.Н.), а также в г. Кемерове в лаборатории исследования гомеостаза отдела диагностики сердечно-сосудистых заболеваний УРАМН НИИ КПССЗ СО РАМН (зав. лаб. канд. мед. наук Груздева О.В.).

Данное исследование одобрено локальным комитетом по этике ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития РФ г. Томска № 2833/1 от 31.11.2011.

2. Материал исследования

Материалом исследования являлись биоптаты слизистой оболочки бронхов (СОБ) правого среднедолевого бронха и бронхиальные смывы (БС), полученные во время бронхоскопии, проводимой по стандартной методике (Robinson D.S., 1998) гибким фиброскопом (BF1T20, Olympus Corporation), а также образцы пристеночной слизи, взятой в процессе индуцированного мокротоотделения у пациентов с БА и ХОБЛ.

3. Методы исследования

Для решения поставленных задач были использованы гистологические, иммуногистохимические, морфометрические, электронно-микроскопические, молекулярно-генетические, цитологические, биохимические, иммуноферментные методы, а также методы статистического анализа данных.

Гистологические методы исследования

Бронхобиоптаты для гистологического исследования обрабатывали стандартным способом (Меркулов Г.А., 1999) с последующей окраской гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии; с целью идентификации выраженности фиброза – пикрофуксином по Ван-Гизону; для выявления морфологии эозинофилов и тучных клеток использовали сочетанную окраску основным коричневым и прочным зеленым.

Биоптаты СОБ изучали с использованием бинокулярного светового микроскопа Carl Zeiss Axioskop 40 FL. При обзорной световой микроскопии оценивали воспалительные, дисрегенераторные (пролиферацию базальных

клеток, наличие плоскоклеточной метаплазии и бокаловидноклеточной гиперплазии), фиброзные процессы.

С помощью цифровой фотокамеры 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/>).

С помощью метода точечного счета Автандилова в бронхобиоптатах определяли удельные объемы (УО) следующих структур ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$): покровного эпителия, отдельных клеточных форм, соединительной ткани, желез, сосудов, а также диаметр капилляров, высоту эндотелиоцитов, высоту эпителиального пласта, ширину базальной мембраны (мкм). Вычисляли бокаловидноклеточный индекс и базальноклеточный коэффициент. Подсчитывали плотность воспалительного инфильтрата с различными клеточными популяциями (макрофаги, лимфоциты, полиморфно-ядерные лейкоциты), общее число их межэпителиальных форм, эозинофилы, тучные клетки. В двух последних клеточных популяциях на 1 мм^2 собственной пластинки СОБ определяли количество низко- (I), умеренно- (II), высоко- (III) гранулированных форм. С целью типирования лимфоцитов в СОБ и оценки экспрессии рецепторов к трансформирующему фактору роста β_1 (TGF- β_1) в бронхобиоптатах проводили иммуногистохимическое исследование с применением антител фирмы Dako к CD4^+ -клеткам (Т-хелперам), CD8^+ -клеткам (Т-цитотоксическим лимфоцитам), фирмы Novocastra к TGF- β_1 . Мембранную экспрессию CD4^+ -, CD8^+ -лимфоцитов в клетках воспалительного инфильтрата оценивали на 1 мм^2 ткани собственной пластинки СОБ.

Экспрессию рецепторов к TGF- β_1 в эпителиоцитах СОБ оценивали по интенсивности окраски срезов с помощью люминесцентного микроскопа «Люам И-3» с фотометрической насадкой ФМЭЛ-2 при длине волны монохроматического света 548 нм.

Молекулярно-генетические методы исследования

В биоптатах СОБ у пациентов с БА определяли выраженность экспрессии мРНК M_3 -холинорецептора (CHRM3), H_1 -рецептора (H1R) и β_2 -адренорецептора (ADRB2) с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, используя коммерческие наборы ООО «Биосан», г. Новосибирск. Определение содержания мРНК экспрессирующих рецепторов проводили путем сравнения пороговых значений флюоресценции маркерного гена и гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, экспрессию которого принимали за 100 %.

Электронно-микроскопическое исследование

Обработку биоптатов СОБ для электронно-микроскопического исследования осуществляли по стандартной методике (Карупу В.Я., 1984). Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB III (Швеция). Полутонкие срезы окрашивали 1 % раствором азура-II и просматривали в световом микроскопе. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом и изучали их в электронном микроскопе JEM-100 CX (Япония). На электронных микрофотографиях в эпителиоцитах бронхиальной стенки вычисляли УО следующих клеточных органоидов ($\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$): митохондрий, эндоплазматического ретикулума, лизосом (Глаголев В.В., 1968; Автандилов Г.Г., 2006). Во внутренней выстилке сосудов СОБ выделяли три типа клеток с предварительным подсчетом доли (%) каждой из эндотелиальной популяции клеток – основного типа, светлые (отечные) и темные (гиперосмированные) эндотелиоциты (Казанская Г.М., Непомнящих Л.М., 2009). Во всех типах эндотелиальных клеток капилляров СОБ подсчитывали объемную плотность микропиноцитозных везикул (МПВ) на люминальной поверхности сосудов ($\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$), удельный объем секреторных гранул Вейбеля – Палади (%), их диаметр (нм).

При электронно-микроскопическом исследовании у пациентов с астмой «brittle» выявляли клетки диффузной эндокринной системы с различным типом ультраструктурной организации секреторных гранул и подсчитывали их диаметр (нм).

Цитологическое исследование

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., 1995).

Индуцированную мокроту (ИМ) получали после ингаляций стерильного 3, 4, 5 % раствора NaCl через ультразвуковой небулайзер «Ультра НЕБ 2000» (Авдеев С.Н., 1998).

В БС и ИМ подсчитывали относительное (%) и абсолютное количество клеток в 1 мл. В цитологических препаратах, окрашенных азуром-II-эозином, идентифицировали не менее 300 клеток с подсчетом следующих типов клеточных популяций: гистиомакрофагальных клеточных элементов, нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, бронхиальных эпителиоцитов обычного строения (БЭОС), бронхиальных эпителиоцитов с признаками дистрофии (БЭСД), бокаловидных клеток (БК). Цитологическая характеристика клеток анализируемых в цитограммах биологических жидкостей проводилась согласно их морфологическому описанию (Ройт А., 1991; Шапиро Н.А., 2005).

Иммунологическое исследование

Надосадочную жидкость БС и ИМ использовали для биохимического исследования и иммуноферментного анализа.

С помощью иммуноферментного анализа в надосадке исследуемых биологических жидкостей определяли концентрацию основных иммунорегуляторных молекул и цитокинов: интерферона- γ (INF- γ), интерлейкина-4, 8, 10 (IL-4, 8, 10), фактора некроза опухоли α (TNF- α), а также TGF- β_1 согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Вектор-Бест» Новосибирск, Roche, Швеция). Результаты учитывали с применением спектрофотометра для микропланшетов Multiscan EX (ThermoLabSystems, Финляндия) при длине волны 450 нм.

Осадок бронхиального содержимого, полученного путем смывов и индуцированного мокротоотделения, использовали для иммунофенотипирования лимфоцитов по CD-маркерам с подсчетом CD3⁺- (зрелые Т-клетки), CD4⁺- (Т-хелперы), CD8⁺- (Т-киллеры/супрессоры), CD19⁺- (В-лимфоциты) клеток методом мультипараметрической двухцветной цитофлюориметрии с помощью меченных флюорохромизотиоционатом моноклональных антител (АО «Сорбент» ГНЦ – институт иммунологии МЗ РФ, Москва). Подсчет производили на 200 лимфоцитов посредством флюоресцентного микроскопа Micros (Австрия) при длине волны 550 нм.

Биохимическое исследование

Регистрацию функциональной активности эластазы и α_1 -протеиназного ингибитора, а также определение концентрации оксида азота проводили в надосадке 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 -протеиназного ингибитора оценивали по торможению аргинин-эстеразной активности трипсина при длине волны 253 нм (Оглоблина О.Г., 1984; Mulgrew A.T., 2004).

Количество оксида азота в БС подсчитывали по концентрации стабильных метаболитов – нитритов, методом, основанным на цветной реакции с реактивом Грисса, с последующей спектрофотометрической оценкой при длине волны 546 нм (Zhao Y.L., 2005).

Измерение активности сывороточного фактора Виллебранда осуществляли агрегометрическим методом на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов Biolaltd при помощи ристомицинового метода (Архипова Б.Ф., 1987).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0. Данные представляли в виде медианы (Me), меру рассеяния – в виде квартильного интервала ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для оценки различий в попарно несвязанных выборках использовали метод Манна – Уитни, для связанных – Вилкоксона. Сравнение показателей в трех несвязанных группах проводили дисперсионным анализом ANOVA Краскела – Уоллиса. Сопряженность между полученными морфологическими, иммунологическими, биохимическими, а также клинико-функциональными данными определяли посредством оценки коэффициентов корреляции рангов Спирмена. Для решения задач распознавания признаков и оценки роли различных маркеров в ремоделировании бронхиальной стенки использовали дискриминантный анализ. Критическим уровнем значимости считали значение $p < 0,05$ (Власов В.В., 2001; Реброва О.Ю., 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших исследований показали, что тяжелая терапевтически резистентная форма БА реализуется эндоскопическими признаками катарального эндобронхита с преобладанием воспалительных и дистрофических изменений. Гистологически это проявляется повышением УО бронхиальных желез и гипертрофией бокаловидных клеток с электронно-микроскопическими признаками гиперсекреции, сочетающимися с редукцией реснитчатого аппарата на эпителиоцитах.

Уплотнение и усиление осмиофилии полиморфных слизистых везикул в комплексе с расширением цистерн эндоплазматического ретикулума и снижением объемной плотности митохондрий в бокаловидных эпителиоцитах сопровождается дискринией слизи и приводит к бронхообструкции с выраженной вариабельностью суточной лабильности бронхов. Последний клинико-функциональный показатель вместе с бокаловидноклеточным индексом и УО эндоплазматического ретикулума в бокаловидных экзокриноцитах – ведущий морфологический маркер тяжелой терапевтически резистентной БА.

Результаты дискриминантного анализа, проведенного в рамках нашего исследования, подтвердили участие тучных клеток в реакциях гиперчувствительности немедленного типа с активацией на них IgE-рецепторов, провоцирующих их дегрануляцию и выброс вазоактивных, провоспалительных и ноцицептивных медиаторов.

Тучные клетки в СОБ могут находиться в различных морфологических формах: высокогранулированные (ТК III типа), умеренногранулированные

(ТК II типа), низкогранулированные (ТК I типа). Считается, что высокогранулированные тучные клетки, локализующиеся при БА преимущественно субэпителиально, дегранулируют с высвобождением триптазы и химазы – ферментов, разрушающих коллаген IV базальной мембраны (Фисенко В., 2007; Marone G., 2005; Okayama Y. et al., 2006). В нашем исследовании у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной астмой наблюдалось снижение плотности высокогранулированных тучных клеток (ТК III типа) и повышение числа низкогранулированных форм (ТК I типа).

В литературе активно обсуждается участие фактора некроза опухоли α (TNF- α), высвобождаемого из гранул тучных клеток СОБ, в развитии бокаловидноклеточной гипертрофии у пациентов с тяжелой астмой (Зуга М.В., 2002; Wilson J.W., 2006).

Считается, что молекулярный механизм этого процесса связан с активацией Toll-like-рецептора типа 4 (TLR4) на мембранах бронхиальных тучных клеток с последующим высвобождением ими TNF- α , который через M₃-холинорецепторы на бокаловидных клетках СОБ и мукоцитах белково-слизистых желез у пациентов с тяжелой астмой индуцирует и усиливает продукцию слизи (Фисенко В., 2006; Bassu S., 2004).

Периваскулярная локализация дегранулированных тучных клеток, обнаруженная нами у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной БА, свидетельствует об их влиянии на гемодинамические изменения, развивающиеся в СОБ у данной группы пациентов. Так, Reuter S. et al. (2008) установлено, что TNF- α , высвобождаемый из ТК, приводит к нарушению обменных процессов в эндотелиоцитах, морфологическим проявлением чего является уменьшение УО МПВ и увеличение диаметра гранул Вейбеля – Паладе, сопровождающееся возрастанием их осмиофилии.

Аналогичные ультраструктурные изменения в эндотелиальных клетках были обнаружены нами у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной БА.

У этих же пациентов нами зафиксирована гиперпродукция оксида азота, свидетельством чего было увеличение концентрации нитрит-аниона в БС. Это обстоятельство, очевидно, явилось причиной дистрофии бронхиального эпителия и выраженной вазоконстрикции. В случае тяжелого течения БА оксид азота метаболизируется преимущественно по пути образования тринитротирозина и пероксинитрит-аниона, обладающих выраженным токсическим действием на бронхиальный эпителий и эндотелий капилляров бронхиальной стенки (Ashutosh K., 2007; Imboden M., 2009).

Развитие гиперреактивности дыхательных путей при фенотипе астмы «brittle» (нестабильная форма), вероятно, осуществляется посредством активации нейрорегуляторных механизмов, косвенным подтверждением чего является увеличение количества клеток диффузной эндокринной системы с признаками усиленной секреции.

Согласно ультраструктурным характеристикам в эпителиальном пласте СОБ определяются ЕС₁-клетки, предположительно, продуцирующие серотонин и субстанцию Р (они содержат мелкие осмиофильные секреторные гранулы диаметром от 463 до 633 нм), гастрин- и вазоактивные интестинальный пептид-продуцирующие клетки (содержат умеренно осмиофильные гранулы диаметром от 820 до 973 нм) и апудоциты, высвобождающие гастрин-рилизинг-фактор (бомбезин, секреторные гранулы размерами от 1242 до 1418 нм, матрикс которых варьировал от электронно-прозрачного до электронно-плотного с «halo») (Евсюкова Е.В., 2006; Groneberg D.A., 2009).

Серотонину и гастрин-рилизинг-фактору (бомбезину), ультраструктурные признаки гиперсекреции которых эндокриноцитами имели место при БА, вероятно, принадлежит ведущая роль в увеличении УО, диаметра и проницаемости сосудов, обнаруженное нами (табл. 1).

В условиях хронической гипоксии, наблюдаемой у пациентов с астмой фенотипа «brittle», усиливается высвобождение перечисленных нейропептидов, способствующих открытию капилляров. В нашем исследовании это документируется увеличением УО и диаметра сосудов открытого типа, развитием отека, интенсификацией микровезикулярного транспорта, появлением светлых эндотелиоцитов с повышением в них УО МПВ (табл. 2, 3).

Округление эндотелиоцитов мелких сосудов является признаком их повышенного тонуса, что имеет адаптационное значение и направлено на поддержание гомеостаза микроциркуляторного русла и более эффективный транскапиллярный обмен (Stamenkovic I., 2003; Feltis B.N., 2006; Donald D.M., 2008; Wilson J.W., 2009).

Интенсификация процессов микровезикулярного транспорта в эндотелиоцитах капилляров СОБ подтверждается в нашей работе увеличением УО МПВ, содержащих факторы активации сосудистой проницаемости, регулирующие реологические свойства крови и гемостаз.

Усиление продукции субстанции Р и вазоактивного интестинального пептида эндокриноцитами, ультраструктурные признаки которого констатировались нами в СОБ у пациентов с БА фенотипа «brittle», может способствовать персистенции воспаления в бронхиальной стенке.

Субстанция Р, как известно, обладает стимулирующим влиянием на макрофаги, активирует на них Toll-like-рецепторы типа 2, направляя дифференцировку Т-клеток в сторону Th2 (Bassu S., 2004).

Таблица 1

Морфометрические показатели слизистой оболочки бронхов у пациентов с различными фенотипами тяжелой терапевтически резистентной БА и ХОБЛ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Исследуемый параметр	Тяжелая стадия ХОБЛ (n=49)	Тяжелая терапевтически резистентная БА	
		«brittle» (n=35)	«астма с фиксированной бронхообструкцией» (n=27)
УО реснитчатых эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,156 (0,121–0,255)	0,131 (0,082–0,181)*	0,081 (0,022–0,101)●
УО бокаловидных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,023 (0,011–0,081)	0,064 (0,031–0,105)*	0,021 (0,012–0,061)◆
УО базальных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,107 (0,031–0,223)	0,051 (0,021–0,092)*	0,053 (0,014–0,085)●
УО желез, мм ³ /мм ³	0,132 (0,054–0,266)	0,381 (0,261–0,553)*	0,191 (0,134–0,324)●●
УО сосудов, мм ³ /мм ³	0,047 (0,032–0,075)	0,115 (0,082–0,131)*	0,065 (0,022–0,091)●●
УО соединительной ткани, мм ³ /мм ³	0,836 (0,602–0,891)	0,512 (0,261–0,555)*	0,751 (0,632–0,851)●●
Высота эпителиального пласта, мкм	83,92 (65,62–94,84)	28,52 (30,62–42,41)*	19,32 (17,81–28,91)●●
Ширина базальной мембраны, мкм	6,48 (2,09–9,35)	12,34 (2,47–28,41)*	16,72 (8,15–29,12)●◆

Примечание: n – количество пациентов; * – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у лиц с БА фенотипа «brittle» и ХОБЛ; ● – статистическая значимость различий (p<0,05) при сравнении показателей у больных с БА фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» и ХОБЛ; ◆ – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у пациентов с БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной бронхообструкцией».

Морфометрические показатели капилляров слизистой оболочки бронхов у пациентов с различными фенотипами тяжелой терапевтически резистентной БА и ХОБЛ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Исследуемый параметр	Тяжелая стадия ХОБЛ (n=49)	Тяжелая терапевтически резистентная БА	
		«brittle» (n=35)	«астма с фиксированной бронхообструкцией» (n=27)
УО капилляров, мм ³ /мм ³	0,032 (0,026–0,041)	0,046 (0,039–0,054)*	0,042 (0,038–0,069) [•]
УО капилляров закрытого типа, мм ³ /мм ³	0,027 (0,017–0,028)	0,014 (0,012–0,024)*	0,021 (0,029–0,032) ^{•♦}
УО капилляров открытого типа, мм ³ /мм ³	0,005 (0,009–0,013)	0,032 (0,027–0,03)*	0,021 (0,019–0,026) ^{•♦}
Диаметр капилляров, мкм	8,144 (8,265–10,172)	15,021 (13,341–16,05)*	12,312 (10,545–14,682) ^{•♦}
Высота эндотелия, мкм	2,226 (2,023–3,251)	4,555 (3,81–5,88)*	4,021 (2,334–5,225) [•]

Примечание: n – количество пациентов; * – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у лиц с БА фенотипа «brittle» и ХОБЛ; • – статистическая значимость различий (p<0,05) при сравнении показателей у больных с БА фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» и ХОБЛ; ♦ – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у пациентов с БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной бронхообструкцией».

Обнаруженное нами сочетание признаков гиперпродукции субстанции Р с увеличением количества макрофагов в СОБ пациентов с БА фенотипа «brittle», несомненно, является существенным компонентом патоморфоза данного фенотипа астмы.

Действительно, у пациентов с астмой «brittle» наблюдается увеличение количества CD4⁺-лимфоцитов в бронхобиоптатах, БС, ИМ с повышением концентрации IL-4 в исследуемых биологических жидкостях (табл. 4).

Переключение иммунного ответа на Th2-зависимый механизм у пациентов с фенотипом астмы «brittle» сопровождается увеличением количества CD19⁺-лимфоцитов в бронхиальном содержимом

и трансформацией последних в плазмоциты с усиленной выработкой Ig E (см. табл. 4).

Таблица 3

Ультраструктурные характеристики эндотелиоцитов капилляров собственной пластинки слизистой оболочки бронхов у пациентов с различными фенотипами тяжелой терапевтически резистентной БА и ХОБЛ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группы пациентов	УО микро-пиноцитозных везикул эндотелиоцитов, мкм ³ /мкм ³	УО секреторных гранул Вейбеля – Палади в эндотелиоцитах, мкм ³ /мкм ³	Диаметр секреторных гранул Вейбеля – Палади в эндотелиоцитах, нм
Тяжелая стадия ХОБЛ (n=49)	0,117 (0,115–0,124)	0,123 (0,120–0,136)	362,23 (317,54–400,22)
Тяжелая терапевтически резистентная БА фенотипа «brittle» (n=35)	0,265 (0,191–0,412)*	0,241 (0,192–0,266)*	494,34 (436,01–597,43)*
Тяжелая терапевтически резистентная БА фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» (n=27)	0,132 (0,11–0,150)♦♦	0,133 (0,111–0,15)♦♦	444,32 (418,69–511,16)♦♦

Примечание: n – количество пациентов; * – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у лиц с БА фенотипа «brittle» и ХОБЛ; ● – статистическая значимость различий (p<0,05) при сравнении показателей у больных с БА фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» и ХОБЛ; ♦ – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у пациентов с БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной бронхообструкцией».

Угнетение Т-клеточного звена иммунного ответа при формировании аллергического воспаления в бронхиальной стенке у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА реализуется индуцибельными CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Т-регуляторными клетками (Treg), количество которых в

периферической крови значительно снижено при кортикостероид-резистентной астме (Jutel M., 2009; Barcelo B., 2010).

Таблица 4

Субпопуляционный состав лимфоцитов бронхиальных смывов и индуцированной мокроты у пациентов с различными фенотипами тяжелой терапевтически резистентной БА и ХОБЛ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Исследуемый параметр	Тип биологической жидкости	Тяжелая стадия ХОБЛ	Тяжелая терапевтически резистентная БА	
			«brittle» (n=35)	«астма с фиксированной бронхообструкцией» (n=27)
CD3 ⁺ -клетки, абс.	Бронхиальные смывы	2,082 (1,514–2,288)	1,998 (1,115–2,033)*	1,325 (1,236–1,614)**
	Индуцированная мокрота	2,352 (2,201–2,724)	2,121 (1,774–2,638)*	1,509 (1,302–1,854)**
CD4 ⁺ -клетки, абс.	Бронхиальные смывы	0,651 (0,181–0,918)	1,478 (0,924–1,640)*	0,785 (0,561–0,925)**
	Индуцированная мокрота	0,776 (0,708–0,994)	1,619 (1,072–1,997)*	0,904 (0,767–1,212)**
CD8 ⁺ -клетки, абс.	Бронхиальные смывы	1,255 (1,103–1,425)	0,398 (0,396–0,577)*	0,709 (0,532–0,802)**
	Индуцированная мокрота	1,436 (1,175–1,623)	0,495 (0,582–0,834)*	0,813 (0,602–0,843)**
CD19 ⁺ -клетки, абс.	Бронхиальные смывы	0,154 (0,128–0,724)	0,307 (0,262–0,396)*	0,174 (0,149–0,216)**
	Индуцированная мокрота	0,169 (0,103–0,328)	0,463 (0,327–0,525)*	0,249 (0,216–0,238)**

Примечание: n – количество пациентов; * – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у лиц с БА фенотипа «brittle» и ХОБЛ; ● – статистическая значимость различий (p<0,05) при сравнении показателей у больных с БА фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» и ХОБЛ; ◆ – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у пациентов с БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной бронхообструкцией».

Снижение количества Трег-клеток у пациентов с астмой «brittle» сопровождается уменьшением образования IL-10 – основного противовоспалительного цитокина, дефицит которого приводит к персистенции активного воспаления в СОБ. Результаты наших исследований подтвердили снижение концентрации IL-10 в БС при исследуемом фенотипе тяжелой БА, а данные дискриминантного анализа продемонстрировали его участие в формировании фенотипических различий астмы (рис. 3).



Рисунок 3. Концентрация цитокинов и ростовых факторов в индуцированной мокроте у пациентов с различными фенотипами тяжелой терапевтически резистентной БА и ХОБЛ:

n – количество пациентов; * – достоверность различий ($p < 0,05$)

при сравнении показателей у лиц с БА фенотипа «brittle» и ХОБЛ;

- – статистическая значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей у больных с БА фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» и ХОБЛ;
- ◆ – достоверность различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей у пациентов с БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной бронхообструкцией»

Обнаруженные факты позволяют отнести воспаление в СОБ при астме «brittle» к эозинофильному, что согласуется с результатами исследований Wensel S.E. et al. (2008), которые в группе больных с тяжелой БА, не разделяя их на клинические фенотипы, выделяют два морфологических варианта: эозинофильный и нейтрофильный.

Известно, что активированные CD4⁺-клетки, плотность которых повышена в СОБ у пациентов с фенотипом астмы «brittle», регулируют созревание и дифференцировку эозинофильных гранулоцитов, а также способствуют их дегрануляции. У пациентов с тяжелой терапевтически резистентной БА фенотипа «brittle» в СОБ одновременно увеличивается количество высокофункциональных эозинофилов (III типа) и эозинофилов (I типа), что является свидетельством высвобождения их гранул (Анаев Э.Х., 1997; Humbles A.A., 2009; Chakir J., 2010).

Выявленная нами прямая корреляция между плотностью ЭФ I типа (дегранулированные формы), клетками реснитчатого эпителия с цитологическими признаками дистрофии ($r=0,84$; $p=0,007$) и суточной лабильностью бронхов ($r=0,77$; $p=0,016$) указывает на прямое участие эозинофильных гранулоцитов в ремоделировании бронхиальной стенки при БА фенотипа «brittle».

Деструктивный эффект катионных белков эозинофильных лейкоцитов у пациентов с тяжелой БА фенотипа «brittle» реализуется в виде дегенерации реснитчатого аппарата эпителиальных клеток СОБ, что проявляется нарушением регулярности расположения ресничек, их полиморфизмом, а также ультраструктурными аномалиями: повреждениями целостности, разрушением аксонемальных комплексов и везикуляцией мембраны, формированием гигантских ресничек с множественными наборами аксонемальных комплексов, и нередко сопровождается образованием цитоплазматических отростков, пиноподий и появлением в цитоплазме эпителиоцитов митохондрий с электронно-плотным матриксом – признаком усиления продукции АТФ.

В нашем исследовании установлено, что УО митохондрий в реснитчатых эпителиоцитах – маркер терапевтической резистентности при астме «brittle». Возможно, повышение УО митохондрий в клетках эпителия бронхов, наблюдаемое у пациентов с астмой «brittle» является компенсаторно-приспособительной реакцией в условиях развивающейся цилиарной дискинезии (табл. 5).

К важным морфологическим маркерам БА фенотипа «brittle» относится гиперплазия гладкомышечных клеток собственной пластинки СОБ с ультраструктурными признаками их дегенерации.

В этих случаях дифференцировка фибробластов в миофибробласты и гладкомышечные клетки регулируется TGF- β_1 и происходит более активно, что, возможно, генетически детерминировано. В культуре фибробластов больных БА зафиксировано наличие мутаций в генах HPRT₁ и RPL_{13A}, которые стимулируют превращение фибробластов в миофибробласты. Добавление в эту культуру эозинофилов, макрофагов и клеток бронхиального эпителия (источников TGF- β_1) усиливает процессы клеточной трансформации (Wicks J., 2006; Ichikawa T., 2008).

При тяжелой терапевтически резистентной БА фенотипа «brittle» повышение бронхиальной гиперреактивности, очевидно, связано с воздействием вирусной инфекции и увеличением экспрессии M₃-холинорецепторов в бронхобиоптатах. Это подтверждается идентификацией вирусных частиц (в 75 % исследуемых случаев) и более высоким уровнем экспрессии мРНК гена M₃-холинорецепторов на гладких миоцитах и клетках воспалительного инфильтрата СОБ у пациентов с астмой «brittle» по сравнению с лицами с астмой с фиксированной бронхообструкцией.

Полученные факты позволяют предположить, что у этой группы пациентов для достижения контроля болезни будет эффективна терапия пролонгированными M-холинолитиками.

Повышенная экспрессия мРНК гена H₁-рецепторов выявлена нами не только на гладких миоцитах, но и на клетках воспалительного инфильтрата (лимфоцитах, эозинофилах, макрофагах). Это указывает на более высокую «сократительную готовность» гладкомышечных клеток собственной пластинки СОБ у пациентов при БА с эозинофильным вариантом воспаления (Parameswaran K., 2006; Bryce P.J., 2010), что подтверждается нашими результатами. У пациентов с БА фенотипа «brittle» морфологическая основа высокой сократительной активности гладких миоцитов СОБ может быть одним из факторов вариабельности просвета бронхов, что констатируется положительной ассоциацией между УО гладкомышечных клеток и суточной лабильностью бронхов ($r=0,83$; $p=0,018$).

В проведенном исследовании наибольшее количество нейтрофильных гранулоцитов, инфильтрирующих СОБ (нейтрофильный вариант воспаления), выявлено при астме с фиксированной бронхообструкцией (гормонозависимой). Этот вариант воспаления сопровождается самыми низкими показателями концентрации Ig E и индекса IL-4/INF- γ в БС и ИМ (см. рис. 3). Инфильтрация бронхиальной стенки нейтрофилами может быть связана с усилением высвобождения макрофагами TNF- α , IL-8, концентрация которых повышена в бронхиальном секрете, полученном путем индуцированного мокротоотделения (см.рис.3).

Таблица 5

Морфометрические показатели ультраструктур эпителиальных клеток слизистой оболочки бронхов у пациентов с различными фенотипами тяжелой терапевтически резистентной БА и ХОБЛ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Исследуемые группы	Т и п ы	Удельный объем, мкм ³ /мкм ³		
		митохондрий	ЭПР	лизосом
Тяжелая стадия ХОБЛ (n=49)	РЭ	0,104 (0,112–0,168)	0,105 (0,091–0,186)	0,044 (0,031–0,062)
	БЭ	0,082 (0,091–0,156)	0,081 (0,102–0,161)	0,042 (0,021–0,065)
	БЗЭ	0,183 (0,092–0,206)	0,104 (0,095–0,182)	0,031 (0,024–0,042)
Тяжелая терапевтически резистентная БА фенотипа «brittle» (n=35)	РЭ	0,241 (0,192–0,381)*	0,185 (0,146–0,305)*	0,045 (0,023–0,064)
	БЭ	0,121 (0,082–0,141)*	0,102 (0,081–0,113)	0,032 (0,021–0,044)*
	БЗЭ	0,113 (0,092–0,161)*	0,086 (0,075–0,103)*	0,041 (0,021–0,063)*
Тяжелая терапевтически резистентная БА «астма с фиксированной бронхообструкцией» (n=27)	РЭ	0,163 (0,142–0,181)♦♦	0,146 (0,128–0,164)•	0,121 (0,084–0,164)♦♦
	БЭ	0,132 (0,107–0,141)♦♦	0,085 (0,062–0,121)	0,021 (0,021–0,045)•
	БЗЭ	0,092 (0,061–0,136)•	0,091 (0,081–0,115)	0,023 (0,021–0,044)•

Примечание: n – количество пациентов; РЭ – реснитчатые эпителиоциты; БЭ – бокаловидные эпителиоциты; БЗЭ – базальные эпителиоциты; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; * – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у лиц с БА фенотипа «brittle» и ХОБЛ; • – статистическая значимость различий (p<0,05) при сравнении показателей у больных с БА фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» и ХОБЛ; ♦ – достоверность различий (p<0,05) при сравнении показателей у пациентов с БА фенотипов «brittle» и «астма с фиксированной бронхообструкцией».

Концентрация IL-8 согласно данным дискриминантного анализа является важным фенотипическим отличием исследуемой формы БА.

Высокая функциональная активность нейтрофилов проявляется и в увеличении продукции ими эластазы, о чем свидетельствует повышение активности фермента у пациентов с астмой с фиксированной бронхообструкцией в БС и ИМ с одновременным ингибированием функционирования α_1 -протеиназного ингибитора.

Известно, что ингибитор эластазы поступает в бронхиальное дерево путем пассивной диффузии из плазмы крови, а также секретируется местно системой активных фагоцитов (Sallenave J.M., 2004; Stockley R.A., 2009; Baraldo S.V., 2011). Последнее подтверждается прямой корреляцией между числом гистиоцитов-макрофагов и активностью ингибитора эластазы ($r=0,56$; $p=0,007$).

Влияние нейтрофильной эластазы на процессы ремоделирования бронхиальной стенки многогранно. Согласно данным Brand P. (2009), при тяжелой БА нейтрофильная эластаза усиливает выработку лейкотриена B_4 , что вносит существенный вклад в развитие бронхиальной гиперреактивности и резистентности к терапии кортикостероидами у данной группы пациентов.

Нейтрофильная эластаза снижает пролиферативную и метаболическую активность базальных эпителиоцитов, что приводит к развитию атрофии эпителиального пласта, которую мы обнаружили у пациентов с нейтрофильным вариантом воспаления в СОБ (см. табл. 1).

Атрофические изменения СОБ у пациентов с астмой с фиксированной бронхообструкцией (гормонозависимой) нередко сочетаются с гистологическими и ультраструктурными признаками программированной клеточной гибели: конденсацией и маргинацией хроматина, неровностью контуров ядер.

Весьма часто в цитоплазме реснитчатых эпителиоцитов в СОБ пациентов исследуемой группы выявляются аутофагосомы, содержащие митохондрии, компоненты их мембран, миелиноподобные фигуры, что сопровождается увеличением УО лизосом в этих же клетках (см. табл. 5). Последний показатель согласно данным дискриминантного анализа является ультраструктурным маркером астмы с фиксированной бронхообструкцией (гормонозависимой).

Известно, что у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной БА на фоне приема системных глюкокортикостероидов снижена экспрессия ингибиторов апоптоза Bcl-2 и повышена активность проапоптотических факторов (Bax, каспазы-3) в реснитчатых эпителиоцитах СОБ. Взаимодействие кортикостероидов с рецепторами подавляет функциональную активность транскрипционного фактора каппа (NF- κ B) в клетках бронхиального эпителия, что стимулирует процессы апоптоза. Считается, что у пациентов с тяжелой БА существует дисбаланс между жизнеспособностью клеток, пролиферацией и

апоптозом, что приводит к нарушению строения эпителиального пласта (Петровский Ф.И., 2005; Деев И.А., 2007; Минеев В.Н., 2011; Bucchieri F., 2007).

При тяжелой астме атрофические изменения касаются бокаловидных эпителиоцитов и клеток белково-слизистых желез. Снижение УО бокаловидных экзокриноцитов в СОБ, наблюдаемое у пациентов с астмой с фиксированной бронхообструкцией (гормонозависимой), сопровождается ультраструктурными признаками деформации процессов слизееобразования, приводящей к увеличению вязкости бронхиального секрета (см. табл. 1). Структурные изменения в бокаловидных клетках у пациентов с данным фенотипом астмы играют ведущую роль в снижении объема форсированного выдоха за 1 секунду, что обуславливает обратные корреляции между бокаловидноклеточным индексом и этим клинико-функциональным тестом ($r = -0,75$; $p = 0,001$).

Повышение активности эластазы и возрастание концентрации TNF- α в бронхиальном содержимом у пациентов с астмой с фиксированной бронхообструкцией (гормонозависимой) сопровождается капилляротрофической недостаточностью, которая документируется уменьшением УО МПВ и появлением большого числа темных эндотелиоцитов.

Уменьшение количества истинных капилляров является доминантным патоморфологическим признаком данной нозологической формы астмы и играет ключевую роль в развитии бронхоконстрикции и бронхиальной гиперреактивности (см. табл. 2).

Известно стимулирующее влияние нейтрофильной эластазы на усиление высвобождения TGF- β_1 клетками бронхиального эпителия (Yamanouchi H., 2008; Hubbard R.C., 2009). Действительно, при астме с фиксированной бронхообструкцией определяются самые высокие показатели экспрессии рецепторов к TGF- β_1 в клетках бронхиального эпителия с одновременным увеличением концентрации этого ростового фактора в ИМ (см. рис. 3).

Высокие показатели активности TGF- β_1 в бронхиальном эпителии сочетаются с большей плотностью клеток фибробластического ряда в собственной пластинке СОБ, что сопровождается утолщением базальной мембраны (см. табл. 1). В таком случае клеточную кооперацию «фибробласты – тучная клетка», выявленную нами при ультраструктурном исследовании СОБ у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией», можно рассматривать и как защитно-приспособительную реакцию, и как признак эпителиально-мезенхимальной дисфункции.

В литературе обсуждается влияние TGF- β_1 на экспрессию гена β_2 -адренорецепторов нейтрофилов, лимфоцитов и гладкомышечными клетками у пациентов с тяжелой БА. При этом астма с фиксированной бронхообструкцией (гормонозависимая) сопровождается однонаправленным повышением экспрессии рецепторов к TGF- β_1 на бронхиальных эпителиоцитах и мРНК гена β_2 -адренорецепторов на нейтрофилах СОБ. Однако увеличение плотности β_2 -адренорецепторов, наблюдаемое нами у пациентов с исследуемым фенотипом тяжелой астмы, не реализуется в бронходилатацию и снижение бронхиальной гиперреактивности несмотря на высокие дозы кортикостероидов. Это может быть связано с синтезом функционально неполноценных рецепторов или со снижением их чувствительности к бронходилатирующим агентам вследствие регулярного использования пациентами β_2 -агонистов короткого действия (McGraw D.W., 2005; Bonacci J.V., 2006; Holgate S.T., 2008).

При ультраструктурном исследовании СОБ у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной БА фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» в эпителиоцитах регистрируются микоплазмы и нанобактерии. Вероятно, эти инфекционные агенты являются триггерами приступов удушья, развивающихся у пациентов с данным фенотипом тяжелой астмы.

В современной клинической практике иногда достаточно сложно осуществить дифференциальную диагностику тяжелой БА и ХОБЛ.

Важным морфологическим маркером структурной перестройки эпителиального пласта при ХОБЛ является плоскоклеточная метаплазия, наблюдаемая практически в 50 % случаев (см. табл. 1).

Плоскоклеточная метаплазия бронхиального эпителия расценивается как пролиферативно-клеточный вариант его реорганизации, связанный с истощением структурно-метаболических резервов клетки и снижением их белок-синтетической функции. При длительно протекающей ХОБЛ плоскоклеточная метаплазия и атрофия бронхиального эпителия в СОБ являются финальными стадиями в цикле возможных превращений реснитчатого эпителия.

Это сочетается с уменьшением размеров секреторных везикул разной степени электронной плотности и нарушением выведения секрета из бокаловидных клеток, идентифицированных на ультраструктурном уровне.

Изменения в эпителиальном пласте, наблюдаемые у пациентов с тяжелой стадией ХОБЛ, состоят в альтерации ядра, редукции белок-синтетического и энергетического аппарата в реснитчатых и бокаловидных клетках, что подтверждается снижением в них УО митохондрий и ЭПР (см. табл. 5).

Согласно данным Непомнящих Г.М. (2010) эти процессы иллюстрируют регенераторно-пластическую недостаточность бронхов.

Проведенный нами дискриминантный анализ свидетельствует, что удельные объемы митохондрий и цистерн ЭПР в бокаловидных экзокриноцитах являются определяющими параметрами фенотипических различий между ХОБЛ и БА.

Эпителиально-стромальная дисфункция, признаки которой идентифицировались в СОБ у пациентов с тяжелой стадией ХОБЛ, проявляется в нарушении структурной организации капиллярного звена микроциркуляторного русла, выраженном более резко, чем при БА.

Дисциркуляторные расстройства, наблюдаемые у пациентов с тяжелой стадией ХОБЛ, характеризуются снижением МПВ на люминальной поверхности эндотелиоцитов, уменьшением диаметра и УО гранул Вейбеля – Паладе, повышением УО капилляров закрытого типа с ультраструктурными признаками реологических расстройств – стаза, сладжа, тромбоза (см. табл. 2, 3). Согласно данным дискриминантного анализа УО сосудов с облитерированным просветом является ведущим признаком ХОБЛ.

У пациентов с тяжелой стадией ХОБЛ отмечено снижение концентрации TGF- β_1 в ИМ, сочетающееся с повышением уровня его экспрессии на периваскулярно расположенных макрофагах (см. рис. 3).

Трансформирующий фактор роста β_1 активирует фибробласты, стимулируя развитие периваскулярного фиброза собственной пластинки СОБ, сопровождающееся снижением у больных показателя объема форсированного выдоха за 1 секунду. Это подтверждается отрицательной ассоциацией между данным клинико-функциональным тестом и плотностью макрофагов, экспрессирующих рецепторы к TGF- β_1 ($r = -0,72$; $p = 0,0001$).

Действие TGF- β_1 проявляется и активацией пула Т-лимфоцитов с повышением их цитотоксического эффекта. У пациентов с тяжелой стадией ХОБЛ количество CD8⁺-клеток повышено в БС и ИМ (см. табл. 4), а по данным дискриминантного анализа именно эти субпопуляции ЛФ играют ключевую роль при дифференциальной диагностике тяжелой стадии ХОБЛ и БА.

Помимо непосредственного цитотоксического действия на клетки бронхиального эпителия, CD8⁺-лимфоциты вырабатывают TNF- α , который усиливает высвобождение IL-8 из макрофагов, что активизирует нейтрофильные лейкоциты и увеличивает общее число их межэпителиальных форм, констатированное нами у пациентов с ХОБЛ.

При длительной персистенции воспаления оксиданты, высвобождаемые, в том числе, из нейтрофилов, разрушают биологические молекулы, следствием

чего является дисфункция органоидов в эпителиальных клетках с последующим развитием регенераторно-пластического дефицита, что установлено в нашей работе, а также в ряде подобных исследований (Кругликов Г.Г., 2003; Jeffery P.K., 2004; Barnes P.J., 2008).

Дисбаланс в системе протеиназы-антипротеиназы у пациентов с тяжелой стадией ХОБЛ документируется выраженным повышением активности эластазы и подавлением антипротеиназной защиты ее ингибитора. Повреждение молекулы ингибитора связано с избыточной активностью протеиназ, действием табачного дыма, активных форм кислорода, миелопероксидазы, которые инактивируют ее активный центр. Молекулы, образующиеся при разрушении α_1 -протеиназного ингибитора (пептид С-31), проявляют провоспалительные свойства, стимулируют хемотаксис нейтрофильных гранулоцитов, их адгезию, дегрануляцию, образование активных форм кислорода (Hill A.T., 2000; Mulgrew A.T., 2004; Zhou Y., 2009). В результате деградации ингибитора возникает неконтролируемое функционирование протеиназ, сопровождающееся повреждением соединительной ткани легких, сокращением внутренней поверхности альвеол и развитием эмфиземы с последующей дыхательной недостаточностью (Аверьянов А.В., 2007; Taipale J., 2005).

Кроме деструктивного действия нейтрофильной эластазы при ХОБЛ, известно ее влияние на высвобождение профиброзных факторов роста FGF-1, FGF-2, которые стимулируют пролиферацию фибробластов и наработку ими труднодеградируемого коллагена, который и формирует фиброз собственной пластинки СОБ (Kohri K., 2001; Shapiro S.D., 2002). Это подтверждается в нашем исследовании отрицательной корреляцией между плотностью нейтрофилов на 1 мм^2 и индексом Тиффно (ОФВ₁/ФЖЕЛ) – важным клинико-функциональным тестом необратимости бронхиальной обструкции, наблюдаемой у пациентов с тяжелой стадией ХОБЛ ($r = -0,89$; $p = 0,0004$). Согласно данным дискриминантного анализа активность эластазы и ее ингибитора играет ключевую роль в фенотипических различиях ХОБЛ и астмы.

Одной из задач настоящей работы являлось сравнение клеточных и молекулярных маркеров изучаемых патологических процессов в БС и ИМ, а также проведение корреляционного анализа между цитологическими, иммунологическими и биохимическими показателями в исследуемых биологических жидкостях.

Отсутствие статистически значимых различий и прямые корреляционные связи между одноименными молекулярными маркерами (IL-4, IL-8, IL-10, TNF- α , TGF- β_1 , нейтрофильная эластаза) в БС и ИМ обуславливают

возможность использования в клинике метода исследования индуцированной мокроты как неинвазивного теста идентификации про- и противовоспалительных маркеров в дыхательной системе.

ВЫВОДЫ

1. Тяжелая терапевтически резистентная бронхиальная астма характеризуется более высокими, чем терапевтически чувствительная форма астмы, показателями функциональной активности тучных клеток и ультраструктурными признаками усиления секреторных процессов в бокаловидных экзокриноцитах слизистой оболочки бронхов.

2. Стимуляция Th₂-зависимого иммунного ответа с эозинофильным воспалением, признаками секреторной активации клеток диффузной эндокринной системы и гипертрофией гладких миоцитов собственной пластинки слизистой оболочки бронхов – морфологические маркеры тяжелой бронхиальной астмы фенотипа «brittle» (нестабильная астма).

3. Ультраструктурные признаки цилиарной дискинезии реснитчатых эпителиоцитов и повышенной сократительной активности гладкомышечных клеток бронхиальной стенки, наблюдаемые у пациентов с фенотипом «brittle» тяжелой бронхиальной астмы, ассоциированы с увеличением экспрессии мРНК генов M₃-холинорецепторов, H₁-рецепторов на клетках воспалительного инфильтрата собственной пластинки слизистой оболочки бронхов, а также с самыми низкими значениями ПК₂₀ – предельной концентрации метахолина, вызывающей падение объема форсированного выдоха на 20 %.

4. Снижение высоты эпителиального пласта, утолщение базальной мембраны, нейтрофильная инфильтрация слизистой оболочки бронхов в сочетании с увеличением концентрации интерлейкина-8 в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте являются доминантными признаками тяжелой бронхиальной астмы фенотипа «астма с фиксированной бронхообструкцией» (гормонозависимая).

5. При астме с фиксированной бронхообструкцией в слизистой оболочке бронхов регистрируются признаки дегенерации эпителиоцитов с усилением экспрессии рецепторов к трансформирующему фактору роста β_1 , а также с повышением содержания мРНК генов β_2 -адренорецепторов на нейтрофилах собственной пластинки слизистой оболочки бронхов, сопровождающиеся снижением суточной лабильности бронхов.

6. Тяжелая стадия хронической обструктивной болезни легких характеризуется плоскоклеточной метаплазией эпителия бронхов с фиброзом бронхиальной стенки, повышением плотности распределения CD8⁺-цитотоксических клеток в слизистой оболочке бронхов с увеличением

концентрации фактора некроза опухоли α в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте.

7. Высокая степень бронхиальной обструкции у пациентов с тяжелой стадией хронической обструктивной болезни легких ассоциирована с регенераторно-пластической недостаточностью эпителиальных клеток слизистой оболочки бронхов, эндотелиальной дисфункцией и усилением экспрессии рецепторов к трансформирующему фактору роста β_1 на периваскулярно расположенных макрофагах.

8. Ведущими дифференциальными маркерами тяжелой бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких являются высота эпителиального пласта, толщина базальной мембраны, плотность распределения $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов в слизистой оболочке бронхов, удельный объем капилляров закрытого типа, концентрация трансформирующего фактора роста β_1 и нейтрофильной эластазы в бронхиальных смывах и индуцированной мокроте.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Цитологическое исследование индуцированной мокроты можно рекомендовать для использования как скрининговый неинвазивный тест для оценки типа, выраженности и активности воспалительных процессов в бронхиальном дереве.

2. Определение количества $CD4^+$ -, $CD8^+$ -лимфоцитов в индуцированной мокроте играет ведущую роль при дифференциальной диагностике различных фенотипов тяжелой бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких.

3. Высокая информативность определения концентрации трансформирующего фактора роста β_1 в бронхиальных смывах позволяет использовать этот метод для оценки структурных и функциональных изменений в бронхолегочной системе при тяжелой бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Экспрессия интерлейкина-5 в мокроте больных бронхиальной астмой /А.Э. Сазонов, Ф.И. Петровский, Е.А. Геренг, И.И. Иванчук, Л.М. Огородова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – № 4. – С. 437–440.

2. Морфофункциональная характеристика бронхиального дерева у морских свинок при моделировании астматического приступа / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, А.Э. Сазонов, Л.В. Капилевич // Актуальные проблемы морфологии :

материалы региональной научно-практической конференции с международным участием. – Красноярск, 2003. – С. 24–27.

3. Корреляционный анализ цитологических показателей индуцированной мокроты и лаважной жидкости у больных бронхиальной астмой /Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, О.С. Кобякова, Ю.А. Петровская // Сибирский медицинский журнал. – Томск, 2003. – Т. 18, № 3. – Вып. 1. – С. 38–41.

4. Структурная организация эозинофилов крови и индуцированной мокроты у больных бронхиальной астмой /Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, Л.М. Огородова, О.С. Кобякова, Ю.А. Петровская // *Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей: тез. докл.* – СПб., 2004. – С. 36–38.

5. Геренг Е.А. Морфологическое состояние слизистой оболочки бронхиального дерева у морских свинок при моделировании астматического статуса / Е.А. Геренг, Е.А. Дьякова, А.Э. Сазонов // *Науки о человеке: тез. докл. 5-го конгресса молодых ученых и специалистов.* – Томск, 2004. – С. 276.

6. Местные клеточные реакции в слизистой оболочке бронхов при хронических заболеваниях легких / И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, Е.А. Геренг, И.Е. Трофимова, М.Б. Червякова // *Клинико-морфологические аспекты общепатологических процессов при социально значимых болезнях: материалы региональной научно-практической конференции с международным участием.* – Новосибирск, 2004. – С. 89–91.

7. Сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей при экспериментальной бронхиальной астме: роль интерлейкина-5 в формировании гиперреактивности бронхов / Л.В. Капилевич, А.Э. Сазонов, Е.Ю. Дьякова, И.С. Попова, А.В. Носарев, Е.А. Геренг // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* – 2004. – Т. 90, № 10. – С. 1262–1269.

8. Сравнительная характеристика эозинофилов крови и индуцированной мокроты у больных бронхиальной астмой / И.В. Суходоло, Е.А. Геренг, Л.М. Огородова, О.С. Кобякова, Ю.А. Петровская, Ю.А. Козлов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2004. – № 1. – С. 59–61.

9. Сравнительная оценка различных методов определения продукции интерлейкина-5 и их клиническое значение при бронхиальной астме /Л.М. Огородова, А.Э. Сазонов, И.И. Иванчук, О.С. Кобякова, Е.А. Геренг, А.П. Копьева // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2004. – № 4. – С. 38–41.

10. Морфофункциональные аспекты сопряженности бронхиальной астмы и гастроэзофагеального рефлюкса / Л.М. Огородова, Р.И. Плешко, И.В. Суходоло, Л.И. Волкова, Н.А. Кривова, Е.А. Геренг // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 54–58.

11. **Тяжелая бронхиальная астма и гастроэзофагеальный рефлюкс: морфофункциональные аспекты сопряженности / Р.И. Плешко, Л.М. Огородова, И.В. Суходоло, Е.А. Геренг // Пульмонология. – 2006. – № 1. – С. 60–63.**
12. Селиванова П.А. Особенности морфологической картины у больных тяжелой бронхиальной астмой / П.А. Селиванова, Е.А. Геренг, Е.С. Куликов // Науки о человеке : тез. докл. 8-го конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск, 2007. – С. 22–24.
13. Геренг Е.А. Диффузная эндокринная система как местный уровень регуляции гомеостатических процессов в организме / Е.А. Геренг, Г.А. Михайлов // Науки о человеке : тез. докл. 8-го конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск, 2007. – С. 173–175.
14. Геренг Е.А. Морфофункциональная характеристика слизистой оболочки бронхов у больных различными формами тяжелой бронхиальной астмы / Е.А. Геренг, П.А. Селиванова // Сибирский консилиум. – 2007. – Т. 62, № 7. – С. 30–31.
15. Геренг Е.А. Морфологическая характеристика бронхобиоптатов у больных различными фенотипами тяжелой бронхиальной астмы / Е.А. Геренг, П.А. Селиванова // Здоровье и образование XXI века : тез. докл. 8-го международного конгресса. – М., 2007. – С. 195–196.
16. Pleshko R.I. Severe asthma and gastroesophageal reflux: morphofunctional mechanisms of interaction / R.I. Pleshko, L.M. Ogorodova, E.A. Gereng // European Respiratory Journal. – 2007. – V. 30. – P. 137–139.
17. **Суходоло И.В. Структурно-функциональная организация клеток диффузной эндокринной системы в дыхательных путях в норме и при патологии / И.В. Суходоло, Е.А. Геренг // Бюллетень сибирской медицины.– 2008. – № 1. – С. 71–76.**
18. Клеточный состав бронхиальных смывов у больных тяжелой бронхиальной астмой /Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, П.А. Селиванова // Морфология. – 2008. – № 2. – С. 31–32.
19. Геренг Е.А. Тканевые изменения слизистой оболочки бронхов при лечении больных тяжелой бронхиальной астмой / Е.А. Геренг, П.А. Селиванова // Актуальные проблемы медицины : материалы региональной научно-практической конференции. – Абакан, 2008. – С. 41–43.
20. Геренг Е.А. Морфологическая характеристика слизистой оболочки бронхов у больных тяжелой гормонозависимой бронхиальной астмой / Е.А. Геренг, Р.И. Плешко, О.С. Кобякова // Морфология. – 2008. – № 3. – С. 32–33.
21. **Патоморфологическая характеристика нестабильной бронхиальной астмы (фенотип brittle) / Л.М. Огородова, П.А. Селиванова, Е.А. Геренг, В.С. Богомяков, Л.И. Волкова, Р.И. Плешко // Терапевтический архив. – 2008. – № 3. – С. 39–43.**
22. Геренг Е.А. Особенности структурно-функциональной организации слизистой оболочки бронхов при гетерогенных воспалительных реакциях в

бронхиальном дереве / Е.А. Геренг, А.Н. Дзюман // Здоровье и образование XXI века : тез. докл. 9-го международного конгресса. – М., 2008. – С. 240–241.

23. Значение цитологических и биохимических факторов в развитии гетерогенных воспалительных реакций в слизистой оболочке бронхов при тяжелой форме хронической обструктивной болезни легких / Е.А. Геренг, А.Н. Дзюман, И.С. Кремис, Э.Р. Абдулаязнова // Науки о человеке : тез. докл. 10-го конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск, 2009. – С. 74–75.

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

25. **Структурно-функциональные изменения в слизистой оболочке бронхов при хронических воспалительных заболеваниях** / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, Л.М. Огородова, О.В. Козина, Е.Б. Букреева, А.Н. Дзюман, П.А. Селиванова, И.С. Кремис // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2009. – Т. 139, № 5. – С. 35–39.

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

27. **Вклад токсических метаболитов оксида азота в формирование эозинофильного воспаления при бронхиальной астме** / О.В. Козина, Л.М. Огородова, Е.А. Геренг, И.В. Петрова, А.Э. Сазонов, В.А. Егоров, Е.В. Комякова // Пульмонология. – 2009. – № 4. – С. 69–73.

28. **Роль клеточных и молекулярных мишеней в формировании различных паттернов воспаления при гетерогенных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы** / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Л.М. Огородова, Р.И. Плешко, Л.И. Волкова, П.А. Селиванова, О.В. Козина, А.Н. Дзюман, О.Е. Акбашева // Пульмонология. – 2009. – № 5. – С. 78–82.

29. **Особенности экспрессии генов NOS в слизистой бронхов при бронхиальной астме** / О.В. Козина, Л.М. Огородова, П.А. Селиванова, Е.А. Геренг, И.В. Петрова, А.Э. Сазонов // Пульмонология. – 2009. – № 6. – С. 78–82.

30. **Огородова Л.М. Участие метаболитов NO в регуляции аллергического воспаления и их вклад в ремоделирование слизистой оболочки бронхов у больных бронхиальной астмой** / Л.М. Огородова, О.В. Козина, Е.А. Геренг // Российский аллергологический журнал. – 2009. – № 5. – С. 11–18.

31. **Взаимоотношения между функционально ведущей тканью и стромой в формировании патологических процессов** / И.В. Суходоло,

- В.А. Казаков, Е.А. Геренг, Р.И. Плешко, И.В. Мильто // Морфология. – 2010. – № 4. – С. 184–185.
32. Геренг Е.А. Роль цитокинов в генерации различных паттернов воспаления в бронхопроводящей системе / Е.А. Геренг, А.А. Селютина // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине : тез. докл. 1-го международного конгресса. – СПб., 2010. – С. 29–30.
33. Геренг Е.А. Роль цитокинов в регуляции функциональной активности и популяционного статуса тучных клеток при аллергическом воспалении в бронхиальном дереве / Е.А. Геренг // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – Т. 25, № 3. – Вып. 2. – С. 56–59.
34. Ультраструктурные характеристики капилляров слизистой оболочки бронхов при различных клинических фенотипах тяжелой бронхиальной астмы / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Л.М. Огородова, Р.И. Плешко, Л.И. Волкова, П.А. Селиванова, А.Н. Дзюман // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2010. – Т. 30, № 6. – С. 105–109.
35. Morphological and Molecular Characteristics of «Difficult» Asthma / P. Selivanova, E. Kulikov, O. Kozina, M. Freidin, L. Ogorodova // Journal of Asthma. – 2010. – V. 47. – P. 269–275.
36. Клеточное звено и цитокиновый профиль лаважной жидкости при тяжелых формах бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, Л.М. Огородова, Е.Б. Букреева, П.А. Селиванова, А.Н. Дзюман, И. С. Кремис, Т.А. Еремина // Медицина в Кузбассе. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 4–9.
37. Сравнительная ультраструктурная характеристика слизистой оболочки бронхов при различных типах воспаления дыхательных путей / 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.
38. Дисперсная эндокринная система и концепция APUD / И.В. Суходоло, И.В. Мильто, Е.А. Геренг, Л.А. Шамардина // Морфология. – 2011. – Т. 137, № 2. – С. 80–89.
39. Молекулярные маркеры воспаления в бронхиальном содержимом при различных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, Л.М. Огородова, П.А. Селиванова, О.С. Кобякова, А.Н. Дзюман // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 3. – С. 24–30.
40. Тяжелая бронхиальная астма / Л.М. Огородова, О.С. Кобякова, И.В. Суходоло, Е.А. Геренг. – Томск: Печатная мануфактура, 2009. – 166 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БА – бронхиальная астма
 БК – бокаловидные клетки
 БС – бронхиальные смывы
 БЭОС – бронхиальные эпителиоциты обычного строения
 БЭСД – бронхиальные эпителиоциты с признаками дистрофии
 ИМ – индуцированная мокрота
 МПВ – микропиноцитозные везикулы
 СОБ – слизистая оболочка бронхов
 УО – удельный объем
 ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
 ЭПР – эндоплазматический ретикулум
 ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение
 IL – интерлейкин
 INF- γ – интерферон- γ
 TGF- β_1 – трансформирующий фактор роста β_1
 TNF- α – фактор некроза опухоли α

Автор выражает признательность д-ру мед. наук, проф., чл.-кор. РАМН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГБОУ СибГМУ Минздравсоцразвития России Огородовой Л.М.; д-ру мед. наук, проф. кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России Плешко Р.И.; начальнику Департамента здравоохранения Томской области д-ру мед. наук, проф., зав. кафедрой общей и врачебной практики ФПК и ППС ГБОУ СибГМУ Минздравсоцразвития России Кобяковой О.С.; зав. кафедрой внутренних болезней ГБОУ СибГМУ Минздравсоцразвития России Волковой Л.И.; заведующему Центральной научно-исследовательской лабораторией ГБОУ СибГМУ Минздравсоцразвития России д-ру мед. наук, проф. Байкову А.Н.; старшим научным сотрудникам Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ СибГМУ Минздравсоцразвития России д-ру мед. наук Шевцовой Н.М., канд. мед. наук Петровой И.В.; начальнику лаборатории электронной микроскопии филиала ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Томске «НПО «Вирион» канд. физ.-мат. наук Миллеру А.А.; аспиранту кафедры внутренних болезней ГБОУ СибГМУ Минздравсоцразвития России Кремису И.А.; канд. мед. наук ассистенту кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России Селивановой П.А.; д-ру мед. наук, проф. кафедры биологии и химии КамГУ им. Витуса Беринга Козиной О.В.; канд. мед. наук доценту кафедры биохимии и молекулярной биологии Акбашевой О.Е.; канд. мед. наук зав. лабораторией исследований гомеостаза отдела диагностики сердечно-сосудистых заболеваний УРАМН НИИ КПССЗ СО РАМН Груздевой О.В.; канд. биол. наук, доценту кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России Мильто И.В.; аспиранту кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России Гутору С.С. за помощь в выполнении диссертационной работы.