

М. М. Островський, М. О. Кулинич-Міськів
ВПЛИВ БАЗОВОГО ЛІКУВАННЯ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО
ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ НА ПРОЦЕСИ МОРФОЛОГІЧНОЇ ПЕРЕБУДОВИ
ТА МІСЦЕВИХ БАР'ЄРНИХ ФАКТОРІВ ЗАХИСТУ СЛИЗОВИХ ОБОЛОНОК БРОНХІВ

Івано-Франківський національний медичний університет

Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) — одне з найобтяжливіших захворювань із погляду інвалідності та економічних витрат, друге за розповсюдженістю інфекційне захворювання в світі, посідає четверте місце в структурі смертності й характеризується стійкою тенденцією до збільшення поширеності в майбутньому в зв'язку з розповсюдженням шкідливих звичок з однієї та здовженням тривалості життя з іншої сторони [1, 2]. В "Європейській білій книзі легень" Україна представлена як одна з країн із найвищим рівнем смертності внаслідок патології дихальних шляхів серед чоловіків [1]. За період 2006–2007 років захворюваність хронічним бронхітом в Україні зросла на 0,51 %, що виводить цю патологію у розряд стратегічних проблем вітчизняної медицини [3].

Особливої агресії перебіг ХОЗЛ набуває у II стадії з початком морфологічної перебудови дихальних шляхів (склероз, фіброз, бронхоспазм, набряк, гіперкринія, дискринія), наслідком яких є ремоделювання бронхів і наступне галопуюче прогресування його системних проявів.

Ремоделювання дихальних шляхів є патологічним процесом, що спостерігається при хронічних запальних і обструктивних захворюваннях органів дихання. Фіброзні зміни мають вирішальне значення в перебудові дихальних шляхів [4–6]. Нещодавно почали досліджувати експресію і функції мускаринових рецепторів у легеневих фібробластах, які здійснюють стимулюючий вплив на синтез колагену [7]. На нашу думку, тривала блокада мускариніндукованого синтезу колагену може бути корисним і раціонально доповнюючим довготривалим ефектом впливу антихолінергічних препаратів при ХОЗЛ. Завдяки бронходилататційним ефектам антихолінергічні препарати представляють собою найважливіший елемент у терапії бронхообструктивного синдрому, особливо при ХОЗЛ [8]. За результатами дослідження UPLIFT (Understanding Potential Long-term Impacts on Function with Tiotropium) селективний М3 холінолітик тіотропій під час лікування пацієнтів із ХОЗЛ протягом 4-ох років продемонстрував тривале покращення функції легень [9]. За період дослідження в групі, пацієнти якої застосовували тіотропій, було зареєстровано зменшення ризику смерті на 16 % ($p = 0,016$), встановлено позитивний вплив такого лікування на виживання ($p = 0,034$), запобігання загостренню хвороби ($p < 0,001$) та значне зменшення ризику дестабілізації перебігу ХОЗЛ, що потребували подальшої госпіталізації (співвідношення ризиків 0,86; $p < 0,002$) порівняно з контрольною групою [9, 10]. Крім того, масштабні клінічні дослідження свідчать про те, що у хворих із ХОЗЛ, лікування з використанням антагоніста мускаринових рецепторів тривалої дії тіотропіуму сприяє затримці погіршення функціонування дихальних шляхів у

динаміці до 4-ох років, що, ймовірно, мало би сприяти інволюції морфологічних змін бронхів [9, 11–14].

На нашу думку ефективність лікування будь-якої патології залежить від глибокого знання всіх ланок її патогенезу. Власне тому, вивчення складних та мульти-системних процесів, котрі відбуваються в організмі при ХОЗЛ, на фоні використання стандартів терапії з включенням препарату тіотропіуму броміду з характерними для нього впливами, є актуальним і буде сприяти розвитку сучасної науки та покращенню розуміння як пацієнтами, так і медичними працівниками необхідності довготривалого базового лікування.

Мета дослідження: оцінити вплив базової терапії ХОЗЛ із використанням препарату тіотропіуму броміду на процеси морфологічної перебудови та місцевих бар'єрних факторів захисту слизових оболонок бронхів.

Матеріал та методи

Обстежено 43 хворих на ХОЗЛ II стадії, у яких верифікацію діагнозу та його формулювання проводили згідно наказу МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р. "Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Пульмонологія" [2]. Дослідження проводили до початку та в динаміці лікування з використанням загальноприйнятих схем терапії (згідно зі стандартами, передбаченими наказом МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р.) та препарату тіотропіум бромід (Спірива® "Берінгер Інгельхайм") інгаляційно 18 мкг, 1 раз на добу [2]. Для вивчення ефективності використання запропонованих нами програм лікування та їх впливу на процеси морфологічної перебудови та стан локальних факторів захисту бронхів 9 хворим на ХОЗЛ II стадії на момент госпіталізації та в динаміці лікування термінами 1, 2, 3, 4 та 6 місяців було проведено біопсії слизової оболонки бронхів. Матеріалом дослідження був бронхо-альвеолярний змив та бронхіальні біоптати, які отримували на рівні біфуркації верхньодольових бронхів до сегментарних під час фібробронхоскопії.

Взяття шматочків тканини бронхіального дерева проводилося за загальноприйнятими правилами, дотримуючись швидкості висікання та атравматичності його різання на шматочки. Бронхіальні біоптати фіксували в 1 % розчині чотириокису осмію на 0,1М фосфатному буфері з рН — 7,4. Матеріал нарізали на кубики, об'ємом 1 мм² та фіксували на протязі 1,5–2 год із триразовою зміною розчину осмію. Після фіксації тканинні блоки відмивали від фіксатора 0,1М фосфатним буфером із наступним зневодненням в етиловому спирті наростаючої міцності (30°, 50°, 70°, 90°, 100°) по 10 хв із триразовою зміною в кожній із порцій. На етапі обезводнення в 70° спирті проводили контрастування тканинних блоків в 2 % розчині уранілацетату, приготованому на 70° спирті. Після закінчення дегідратації матеріал пропускати через абсолютний спирт із абсолютним ацетоном (10 хв) та через абсолютний ацетон (10 хв). В подальшому — через розведення ацетону з епоксидними смолами (3:1–30 хв; 1:1–1 год); потім

РЕШЕНИЕ ЕМЕА ОБ ОТКАЗЕ В РЕГИСТРАЦИИ ПРЕПАРАТА FACTIVE

17 июня 2009 года европейская компания Menarini решила отозвать свою заявку о регистрации препарата Factive (гемифлоксацин) в подконтрольной ЕМЕА (European Medicines Agency) зоне (все страны ЕС).

1. ЕМЕА считает, что гемифлоксацин обладает более выраженным генотоксическим эффектом (влияние на генетические процессы), чем все другие препараты группы фторхинолонов.
2. Указано, что недостаточно данных о доказательствах эффективности применения гемифлоксацина в лечении больных негоспитальной пневмонией пятидневным курсом.
3. Комитет ЕМЕА также считает, что применение гемифлоксацина для обострений хронического бронхита не было подкреплено достоверными данными клинических исследований (в проводимых исследованиях были серьезные ошибки в дизайне). Таким образом, ЕМЕА сделало заключение, что в соотношении польза/риск риск существенно превышает пользу.

Компания Menarini согласилась с решением ЕМЕА.

*(Письмо ЕМЕА с обоснованием отказа размещено на сайте
http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/factive/withdrawal_letter.pdf)*

матеріал знаходився 1 год у чистій смолі. Далі шматочки матеріалу поміщали в желатинові капсули та заливали смолою з наступною полімеризацією при температурі $+60^{\circ}\text{C}$ протягом доби. Напівтонкі зрізи, товщиною 1 мкм, зафарбовували 1 % розчином метиленового синього для світлооптичного вивчення та орієнтації обраної ділянки для наступного електронномікроскопічного дослідження.

Отримані на ультрамікромікроскопі Tesla BS-490A зрізи монтували на мідні бленди діаметром 1 мм із формваровою підложкою (для оглядових зйомок) або на опорні сітки. Для збільшення контрастності зрізи доконтрастували в 2 % розчині ураніацетату на 70° спирті й сумішшю Рейнольдса. Вивчення матеріалу проводили на електронному мікроскопі ПЕМ-125 К при прискорюючій напрузі 75 кВ з наступним фотографуванням при збільшенні від 2000 до 25000 раз.

Вміст колагену-IV досліджували в бронхо-альвеолярній рідині 43 хворих на ХОЗЛ II стадії у терміни до та в процесі 1-го, 2-го та 6-ти місяців прийому препарату тіотропіум бромід методом імуноферментного аналізу на аналізаторі "StatFax 303 Plus" за допомогою реагентів "Biotrin Collagen IV EIA". Детекцію активності лізоциму бронхо-альвеолярного вмісту в цій же когорті пацієнтів проводили за методом О. В. Бухаріна (1974), визначення секреторного імуноглобуліну А — за методикою Mancini et al. у модифікації Е. Г. Ларенко і М. П. Кравченко (1991).

Контрольну групу склали 15 практично здорових осіб (ПЗО) без наявних ознак захворювань дихального тракту та іншої патології внутрішніх органів.

Результати та їх обговорення

У бронхіальних біоптатах, отриманих від хворих на ХОЗЛ II стадії, що були госпіталізовані у фазі загострення, до лікування виявлені значні порушення компонентів слизової оболонки — епітеліального вистелення і сполучної тканини власної пластинки.

Ультрамікроскопічний аналіз показав, що епітеліоцити слизової оболонки виявляли альтеративні і дистрофічні зміни. На зрізах ідентифікувалися епітеліоцити різного функціонального стану, зокрема, розрізнялись "темні", "проміжні" і "світлі" епітеліоцити слизової оболонки бронха. У "темних" епітеліоцитах ідентифікувалися округлі ядра з помірною конденсацією хроматину. В цитоплазмі "темних" клітин — спостерігалися численні цистерни гладкої ендоплазматичної сітки на тлі темнозабарвленої цитоплазми з присутністю великих осміофільних включень різної форми, поодинокі фаголізосоми. На поверхні таких епітеліоцитів — розріджені війки різної довжини. Такі клітини часто мали полігональну форму і своїми відростками занурювалися між "світлими" епітеліоцитами. Клітини з'єднувалися між собою простими міжклітинними контактами і десмосомами, які є зонами злипання і утримують клітини між собою. У всьому полі зору міжклітинні простори між плазмолемами розширені і виявляють розходження мембран. Тобто такі зміни належать до катарально-склеротичного запалення.

У "світлих" епітеліоцитах ядро мало неглибокі інвагінації, еухроматин, перинуклеарна цистерна не розширена. У цитоплазмі — численні рибосоми і полісоми, вакуолі невеликих розмірів, мітохондрії в стані часткової деструкції. Комплекс Гольджі — звичайного вигляду. В апікальному полюсі — осміофільні гранули і паличкоподібні утворення.

У "проміжних" за щільністю забарвлення цитоплазми — ядра округлі, наявний еухроматин. У їх цитоплазмі,

яка виглядає світлішою, порівняно з "темними", спостерігаються вакуолі й осміофільні гранули в невеликій кількості, дрібні мітохондрії, численні рибосоми і полісоми.

На апікальному полюсі епітеліоцитів прослідковувалися ознаки часткової деструкції війкового апарату: типові численні неоднакової довжини війки і ділянки денудатії апікальної поверхні. Війки мали різну довжину. Частина базальних тілець, які лежать в основі війок, були занурені в цитоплазму епітеліоцита. Між ними прослідковувалися оточені мембраною везикули (з облямівою).

Келихоподібні клітини виявлялися в незначній кількості і знаходилися в різних фазах секреторного циклу. Одні з них містили велике число накопичених у цитоплазмі гранул слизу без ознак їх виведення за межі клітини. Інші — знаходилися на стадії початку секреторного циклу синтезу слизу — гранули секрету містилися лише в базальній частині клітини.

Базальні клітини мали звичайну будову. В ядрах переважав еухроматин. В окремих із них містилися два ядра. Подекуди ідентифікувалися базальні епітеліоцити на різних фазах мітозу.

У сполучній тканині власної пластинки слизової оболонки бронха виявляються дистрофічні і склеротичні зміни з порушенням кровопостачання. Склерозуючі зміни виявились найбільш вираженими в підепітеліальній зоні, де спостерігалися товсті пучки колагенових волокон.

У клітинному компоненті, в першу чергу, ми спостерігали численні макрофаги, в яких виявлялись значні ультраструктурні зміни. По периметру макрофага ідентифікувалися видовжені псевдоподії і мікроворсинки плазмолем.

Ядра макрофагів переважно округлі і бобоподібної форми з конденсованими грудочками гетерохроматину. Часто спостерігалися м'які інвагінації каріолеми, підмембранна конденсація гетерохроматину. Перинуклеарний простір дещо розширений. Довкола ядра — елементи гранулярної ендоплазматичної сітки і мітохондрії. У периферійних відділах цитоплазми помірна кількість дрібних мітохондрій, вакуолей, лізосом і фаголізосом із везикулярним чи електроннощільним осміофільним зернистим матеріалом. Серед мітохондрій визначались органели округлої і видовженої форми. Частина з них мала набряклий, просвітлений матрикс. Контури зовнішньої мітохондріальної мембрани місцями контурувались нечітко. Кристи внутрішньої мітохондріальної мембрани ідентифікувались нечітко. Лізосоми в цих ділянках переважно належали до вторинних. Третинні лізосоми (залишкові тілця) траплялися в помірній кількості. Вакуольний компонент цитоплазми був представлений великою кількістю гідропічних вакуолей. Наявність у макрофагах залишкових тілець і вакуолей характеризує розвиток у них дистрофічних процесів, з одного боку, і перевагу кінцевих етапів фагоцитозу — з іншого. Саме присутність макрофагів при хронічному запаленні у хворих із ХОЗЛ свідчить, на думку Р. К. Jeffery (2001), про специфічність морфологічних змін, характеризуючих ХОЗЛ, порівняно із запальними проявами при астмі [15].

Фібробластичний ряд клітин підлегло до епітеліального вистелення сполучної тканини слизової оболонки бронха був представлений фібробластами, фіброцитами і міофібробластами.

Фібробласти мали видовжену форму, їх оточували численні колагенові волокна в різних проекціях і різного ступеня зрілості, розділені проміжками, заповненими основною аморфною речовиною. Ядро відповідало зов-

нішній формі фібробласта. Інколи ядро мало форму "піщового годинника". У ньому виявлялась периферійна конденсація хроматина. Каріолема тісно пов'язана з навколишніми елементами ендоплазматичної сітки.

У цитоплазмі активних фіброblastів сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки бронха — велика кількість вакуолей, численні цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки та вільні полірибосоми, невелика кількість вакуолей, гіпертрофія комплексу Гольджі, мультівезикулярні тілця. Розташування пластинчастого комплексу Гольджі було не тільки біля ядра фіброblastів, але й в інших частинах клітини, що характеризує його високу активність і можливість секретувати продукти усією поверхнею клітини [16].

Фіброblastи вирізнялись за ступенем забарвлення цитоплазми — визначались клітини з "темною" цитоплазмою, видовженими ядрами і довгими цитоплазматичними відростками, і "світлі" — із вакуолями і мітохондріями.

Ми спостерігали також більшу, ніж у здорових осіб, кількість фіброцитів в оточенні численних колагенових волокон. Загалом, у здорових фіброцити виявляються рідко через їх малу численність. Наявність фіброцитів, як дефінітивної форми фіброblastів, засвідчує появу старих клітин із пониженою секреторною активністю, але зберігаючи функції регуляції метаболізму і механічної стабільності сполучної тканини.

У значній кількості фіброblastів у цитоплазмі виявлялися тонкі мікрофіламенти, які розташовувалися без певного порядку між органелами, що надає підстав віднести їх до міофіброblastів. За класичними поглядами, мікрофіламенти є частиною скоротливого апарату багатьох клітин і складають основу цитоскелету клітини. Виявлені фіброblastи/міофіброblastи мали ядро з численими інвагінаціями каріолеми (у стані гіперфункції) та незвичайні "депозити" гранулярного матеріалу в цитоплазмі клітини (міофібрили на поперечному перерізі). Пучки мікрофіламентів посідали понад половину площі цитоплазми. Такі видовжені пучки мікрофіламентів були ідентичні контрактильному апарату, який присутній у гладких міоцитах стінки бронхів. Довкола клітин містилися колагенові волокна і тонкі нитки протофібрилярного матеріалу.

Міофіброblastи в стінці бронха при алергічному подразненні були описані W. R. Roche et al. [17]. Ці автори класифікували їх як фіброblastи/міофіброblastи. Пізніше з'явилися роботи, в яких такі перетворення фіброblastів пояснювались дедифференціацією гладких міоцитів на міоцити "секреторного" фенотипу [18] і їх переміщенням у власну пластинку слизової оболонки до підепітеліального шару, але вони не знайшли належного підтвердження в науковій літературі.

Нами в підепітеліальному шарі сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки бронха виявлено фіброblastи/міофіброblastи, в будові яких переважа-

ють структурні ознаки клітин фіброblastичного ряду, які можуть, за сучасними уявленнями, відігравати ключову роль у надлишковій продукції колагену і процесах фіброзування стінки повітроносних шляхів при ХОЗЛ [19, 20]. Підтвердженням описаних процесів слугує й виявлене нами збільшення в 6,19 рази вмісту колагену IV в бронхоальвеолярній рідині хворих на ХОЗЛ II стадії до лікування порівняно із групою контролю ($p < 0,05$) (табл.). На нашу думку, підвищення вмісту колагену-IV у бронхоальвеолярній рідині при ХОЗЛ є свідченням збільшення активності фіброblastів/міофіброblastів (на тлі порушень мікроциркуляції, активації перекисного окислення ліпідів та явищ гіпоксії), вираженості потовщення базальних мембран, а відтак і порушення процесів як обміну у власних біологічних системах, так і дисоціацію ряду лікарських форм, особливо інгаляційних.

У підепітеліальному компартменті власної пластинки слизової оболонки бронха виявлялись також лімфоцити, які належали за розмірами до середніх і великих лімфоцитів (плазматичні клітини). Середні лімфоцити мали округлу форму. Ядро — кругле, периферійна конденсація хроматину і кілька грудочок гетерохроматину в центрі. Контури плазмолемі лімфоцита гладкі, ідентифікувалося кілька цитоплазматичних виростів. У вузькому обідку цитоплазми — помірна кількість мітохондрій і елементів ендоплазматичної сітки. Відомо, що імунотоксичними методами дослідники встановили їх приналежність переважно до CD8⁺ Т-лімфоцитів і підтвердили їх значну роль у ремоделюванні стінки дихальних шляхів у патогенезі ХОЗЛ [21, 22]. Плазматичні клітини (плазмоцити) містили численні цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки, що вказує на їх високу задіяність у синтезі імуноглобулінів, а встановлений нами дефіцит sIgA в бронхоальвеолярному вмісті (табл.) засвідчує, що, не зважаючи на його напружену продукцію в фазу загострення ХОЗЛ II, спостерігається перевитрата даного локального протективного фактору слизових і порушення бар'єрних захисних механізмів. До ще глибшої депресії локального захисту слизових дихальних шляхів призводить і виявлене нами зменшення у 2,03 рази рівнів лізоциму бронхоальвеолярного вмісту у хворих на ХОЗЛ II порівняно із групою контролю ($p < 0,05$) (табл.). Відомим є факт, що при ХОЗЛ тривале перевантаження фагоцитуючих клітин антигенними стимулами та продуктами запального процесу призводить до розладів у системі альвеолярних макрофагів, сурфактанту легень, імунному захисті [1, 8]. Вище наведені причини власне і провокують зрив синтезу поліморфноядерними та мононуклеарними фагоцитуючими клітинами лізоциму [8].

Водночас на зрізах слизової оболонки бронха в сполучній тканині її власної пластинки ми виявили поодинокі фіброblastи/фіброblastи. Це клітини, які мали ознаки фіброblastів, тобто продуцентів колагену, і фіброblastів, які резорбують колаген. За фіброblast свідчили: верете-

Таблиця

Динаміка показників колагену IV та факторів локального захисту слизових оболонок бронхів у процесі лікування хворих на ХОЗЛ II стадії із використанням препарату тіотропію броміду

Показники	ПЗО n=15	До лікування n=43	1 місяць n=39	2 місяці n=21	6 місяців n=11
Колаген IV	9,87 ± 0,52	61,14 ± 1,28	43,27 ± 1,17	24,72 ± 1,15	14,07 ± 0,83
Лізоцим	11,16 ± 0,87	5,49 ± 0,15	8,63 ± 0,13	10,58 ± 0,15	10,74 ± 0,17
sIgA	2,15 ± 0,08	1,27 ± 0,08	1,89 ± 0,09	2,07 ± 0,11	2,13 ± 0,14

Примітка. Вірогідність різниці показників між групами й контролем та до і в процесі лікування — $p < 0,05$

ноподібна форма, велике світле ядро з ядрцем. У цитоплазмі — розвинена гранулярна ендоплазматична сітка з плоскими неактивно функціонуючими цистернами. Ознаками фіброкласта були великі вакуолі у цитоплазмі, всередині яких часто визначались лізосоми. Поверхня клітин мала інвагінації. Клітини знаходилися в оточенні дрібного пластівцеподібного матеріалу.

Результати нашого дослідження показали, що при ХОЗЛ вже у II стадії має місце пошкодження слизової оболонки бронхів зі значним розростанням сполучної тканини в її власній пластинці. Вважають, що хронічне пошкодження епітелію слизової оболонки і його репаративна регенерація при цьому відбувається через активацію і постійну секрецію прозапальних цитокінів, які впливають на епітелій, і ростових факторів, які призводять до наступного хронічного запалення і ремоделюючих реакцій в підепітеліальних компартментах. Ці фактори включають епітеліальний фактор росту і гранулоцитмакрофаг-стимулюючий фактор і в подальшому індують пошкодження підлеглої базальної мембрани, шляхом активації сусідніх фібробластів/міофібробластів, і більш глибоко розташованих структур, включаючи бронхіальні гладкі м'язи, слизові залози і стінки кровоносних судин [23].

У динаміці лікування через 1 місяць прийому комплексного лікування фази загострення ХОЗЛ II стадії з включенням тіотропію броміду в якості базової терапії, в епітеліоцитах слизової оболонки на апікальному полюсі спостерігалися короткі тонкі війки. В окремих з епітеліоцитів прослідковуються базальні тільця. Цитоплазма ущільнена, містить прозорі вакуолі, електроннощільні включення не обмежені мембраною, комплекс Гольджі, гранулярну ендоплазматичну сітку. Органели ідентифікуються важко через ущільненість цитоплазми. Ядро має м'які випини і заглиблення, еухроматин. У келихоподібних клітинах виявлялись гранули слизу, що відповідало різним фазам секреторного циклу. Чітко прослідковувалось виведення гранул слизу з клітин.

Найбільш виражені зміни відбулися у власній пластинці слизової оболонки бронха. Морфологічні прояви активності макрофагів зменшились. Макрофаги зберегли ворсинки на поверхні, що є однією із постійних ознак цієї клітини. У цитоплазмі макрофагів спостерігали помірну кількість органел, але вони не містили фагоцитарних вакуолей. Ядро видовженої форми з периферійною конденсацією хроматину. Такі макрофаги можна віднести до перехідних між I і II типом (В. В. Серов, 1981). Морфологічно макрофаги I типу — моноцитоїдні, округлої форми, із бобоподібним ядром, невеликим об'ємом цитоплазми і нечисленними випинаннями плазмолемми. У цитоплазмі ідентифікуються вільні рибосоми і полісоми, що надає цитоплазмі ущільненого вигляду. Визначаються також елементи ендоплазматичної сітки — гранулярної і агранулярної. Макрофаги II типу належать до зрілих макрофагів, а їх активність забезпечується наявністю в цитоплазмі численних органел, серед яких велика кількість вільних рибосом і полісом, первинних, вторинних і третинних лізосом, достатньо розвинені гранулярна ендоплазматична сітка і комплекс Гольджі. Свідченням розвантаження макрофагальних клітин та їх переорієнтацією на підтримку санагенетичних процесів розрішення запального процесу є й тенденція до відновлення рівнів лізоциму в бронхоальвелярному вмісті, який зріс на 57,2 % від вихідних значень до лікування ($p < 0,05$), проте залишався все ж меншим від даних у групи контролю (табл.).

У зрілих фіброблестах, які розміщувалися в оточенні пучків колагенових волокон і аморфної речовини, ядро витягнутої форми з помірно вираженими інвагінаціями і невеликою кількістю елементів гранулярної ендоплазматичної сітки. Цистерни цієї органели виявляли помірно розширені профілі і містили ніжноволокнистий вміст. У мішечках комплексу Гольджі також виявлялися тонкі структури, які відповідають синтетичним продуктам колагену. Тобто, за морфологічними ознаками фібробласти в переважній більшості належали до клітин із помірно вираженими ознаками синтетичних процесів — у даному випадку синтезу колагену. Поруч із фіброблестами звичайної будови спостерігались міофібробласти неправильної форми, що мали невеликий об'єм ущільненої цитоплазми. Їх ядро неправильної форми зі значною периферійною конденсацією (маргінацією) хроматину. У цитоплазмі — вакуолі, гетерогенні за будовою мітохондрії, осміофільні включення. Міофібробласти відрізнялись за будовою від таких самих клітин до лікування. Зміни їх будови характеризували процеси зморщення міофібробластів і ослаблення їх функції, що може бути реакцією на використання селективного МЗ холінолітика тіотропію броміду, яка опосередковується блокуванням мускаринових рецепторів. Поряд із цим нами ідентифіковано й зменшення в 1,41 рази, порівняно з даними до лікування ($p < 0,05$) (табл.), рівнів колагену IV в бронхо-альвелярному вмісті під впливом лікування з використанням препарату тіотропію броміду протягом 1 місяця, що є промінім свідченням фізіологічного скерування процесів репарації, інгібіції явищ неоклаєногенезу та реалізації на цьому підґрунті каскаду ефектів інгібіції ремоделювання.

У цей же термін у власній пластинці слизової оболонки бронха в пухкій волокнистій сполучній тканині виявлялись плазматичні клітини (плазмоцити) в активному стані, за що свідчила наявність у цитоплазмі розширених цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки, вміст яких мав помірну електронну щільність. Ядро посідає значну частину цитоплазми. Хроматин ядра — частково конденсований рівномірно по усій каріоплазмі. Паралельно до виявлених морфологічних змін ми спостерігали й часткове відновлення рівнів IgA в бронхоальвелярному вмісті через 1 місяць запропонованої терапії хворих на ХОЗЛ II стадії, який зріс на 61,0 % ($p < 0,05$), проте залишався у 1,14 рази меншим від по-казників групи контролю — $p < 0,05$ (табл.).

Таким чином, на кінець першого місяця лікування гістологічна картина слизової оболонки бронха виявляла ознаки поліпшення морфофункціонального стану як клітин епітеліального вистелення бронха, так і підлеглої сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки. На апікальному полюсі епітеліоцитів спостерігалися ознаки впорядкування війкового апарату. У цитоплазмі зменшувалась вакуолізація, але зберігалось ущільнення цитоплазми. Макрофагам була притаманна будова, яка відповідала проявам помірної активності. Фібробласти містили незначну кількість білоксинтезуючих органел. Плазмоцити зберігали достатньо чіткі обриси гранулярної ендоплазматичної сітки, але її вміст був меншим від стану до лікування.

У біоптатах слизової оболонки бронха при електронномікроскопічному дослідженні через 2 місяці використання тіотропію броміду прослідковувалась подальша динаміка позитивних структурних змін її складових.

На апікальній поверхні епітеліоцитів виявлялись численні війки. У цитоплазмі велика кількість вільних рибосом

і полісом, мітохондрій, невеликі прозорі вакуолі в апікальному полюсі. У келихоподібних клітинах гранули секрету не виявляли відмінностей від таких у нормальних клітинах.

У сполучній тканині власної пластинки слизової оболонки переважна кількість фібробластів мала ядро витягнутої неправильної форми з периферійною конденсацією хроматину, у цитоплазмі спостерігалась невелика кількість вакуолей, мітохондрії ідентифікувалися в незначній кількості, число інших органел обмежено. Тобто ці фібробласти морфологічно виявляли ознаки неактивного стану. Навколо фібробластів визначались пучки колагенових волокон. Часто ідентифікувались групи вакуолізованих міофібробластів, ядра яких з численними вакуолями різних розмірів і периферійною конденсацією хроматину (каріопікноз). У цитоплазмі клітини численні вакуолі і гомогенізована гіалоплазма. Це засвідчувало дегенерацію міофібробластів під впливом використання тіотропію броміду, наслідком чого було зменшення синтезу колагену.

Окремо хочемо зазначити, що нами встановлено подальші позитивні тенденції відновлення локальних захисних бар'єрів слизових оболонок бронхів (зростання лізоциму на 22,6 % ($p < 0,05$) та sIgA на 9,5 % ($p < 0,05$) в бронхо-альвеолярному вмісті хворих на ХОЗЛ II стадії порівняно із станом через 1 місяць лікування) та інгібіцію явищ неколагеногенезу (зменшення на 79,4 % колагену IV ($p < 0,05$)) при використанні препарату тіотропіуму броміду впродовж 2 місяців (табл.).

На кінець третього місяця увагу привернули міофібробласти у стані дегенерації, які часто мали пікнотичне ядро, ущільнену, гомогенну і місцями вакуолізовану цитоплазму.

Епітеліоцити слизової оболонки на кінець 4-го місяця не відрізнялись за будовою від попереднього терміну лікування. Особливістю морфологічної картини була наявність у власній пластинці фібробластів типової будови: видовженої форми з двома полюсами. Їх ядра також переважно довгастої форми. Розподіл хроматину не вирізнявся особливостями. Перинуклеарна цистерна помірно розширена. Ззовні від ядра спостерігалася помірна кількість мітохондрій і цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки, які тісно прилягали до ядра. У цитоплазмі фібробластів вільні рибосоми і полісоми, мітохондрії та цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки. Поверхня плазмолемі фібробласта мала невеликі за розмірами відростки. Тобто, це фібробласти, які наближаються за будовою до фіброцитів. Вважається, що синтез колагену і глікозамінгліканів аморфної речовини сполучної тканини в цих клітинах різко зменшений [16].

Після лікування протягом 6 місяців епітеліоцити щільно прилягали один до одного. На перерізі їх ядра мали круглу форму, ядерця чітко ідентифікувалися. Хроматин ядер, — переважно, — еухроматин. У цитоплазмі епітеліоцитів визначалися мітохондрії звичайної будови, елементи ендоплазматичної сітки — гранулярної та агранулярної, тонкі цитопіламенти, вільні рибосоми і полісоми. Тобто, морфологічних ознак набряку чи дистрофічних змін епітеліальних клітин не виявлено.

У сполучній тканині власної пластинки слизової оболонки спостерігалось нормальне співвідношення клітин, характерне для цієї тканини. Біля фібробластів прослідковувалися колагенові волокна, що мали в різних ділянках ознаки дезінтеграції — неоднакове розташування від паралельних потужних пучків колагенових волокон до невеликих сітчастих утворень і розпадом до зернистих

мас. Ми розцінюємо наявність пучків колагенових волокон різної товщини і орієнтації проявами колагенолізу.

Питання деградації колагену за умов проведеного лікування ХОЗЛ набуває першорядної ваги, оскільки при його розвитку посилюються процеси фібротизації сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки бронхів. Відомо, що різні клітини мають суттєві відмінності колагенолітичної функції. Зокрема, цю функцію в стінці бронха при запальних процесах можуть виконувати макрофаги і фібробласти. Макрофаги викликають позаклітинну деструкцію колагенових волокон шляхом секреції лізосомальних ферментів і їх викиду за межі макрофага. У подальшому макрофаги фагоцитують зруйнований колаген і завершують процес розщеплення молекул колагену. Тобто роль макрофагів за цих умов полягає в очищенні сполучної тканини власної пластинки бронха.

Фагоцитарна функція фібробластів відрізняється від макрофагальної тим, що є імунонезалежною через відсутність на їх поверхні рецепторів до імуноглобулінів і комплементу. Водночас на поверхні фібробластів виявлені специфічні рецептори до колагену. Це дозволяє допускати думки про те, що поява в міжклітинній речовині надлишкового колагену розпізнається фібробластами і слугує сигналом до його фагоцитозу. Фібробласти, які містять вакуолі і численні лізосоми, здійснюють резорбцію колагену і в яких переважають процеси фіброклазії, стають фіброкlastами. Ми спостерігали фіброкlastи в сполучній тканині до лікування, що засвідчувало їх участь у процесах резорбції колагену. У процесах колагенолізу також беруть участь тканинні базофіли та лімфоцити, які продукують відповідні цитокіни, що посилюють утворення колагенази іншими клітинами. За звичайних умов в організмі існує динамічна рівновага між біосинтезом і катаболізмом колагену, коли обидва протилежно спрямованих процеси здійснюються фібробластами.

У нашому дослідженні слизової оболонки в процесі впливу на неї базової терапії тіотропію броміду протягом 6 місяців ми не виявили високої активності тканинних базофілів. Тобто, механізм зменшення колагену у власній пластинці слизової оболонки міг бути наслідком не підвищеного колагенолізу, а зменшення його синтезу. За останнє свідчить факт поступового зменшення числа міофібробластів у сполучній тканині. На підставі виявлення на легених фібробlastах людини мускаринових рецепторів (M1, M2, M3) і висновку про контроль колагенезу мускариновими механізмами [7], ми можемо допуститися думки про вплив селективного M3 холінолітика тіотропію броміду на міофібробlastи з метою їх унормування. Підтвердженням чому є встановлене нами (табл.) достовірне зменшення рівнів колагену IV в бронхо-альвеолярному вмісті хворих на ХОЗЛ II стадії в динаміці 6-місячного спостереження під впливом лікування із використанням препарату тіотропіуму броміду, що паралельно супроводжувалося відновленням та стабілізацією локального захисного бар'єру слизових оболонок бронхіального дерева.

Висновки

При ХОЗЛ вже у II стадії мають місце розлади локального захисного бар'єру та пошкодження слизової оболонки бронхів із значним розростанням сполучної тканини в її власній пластинці, чітко ідентифікуються альтерація базальної мембрани, наявність фібробlastів, активація фібробlastів/міофібробlastів та слизових залоз, що супроводжується достовірним збільшенням колагену IV в

6,19 рази ($p < 0,05$) та зменшенням рівнів лізоциму в 2,03 рази ($p < 0,05$) й sIgA в 1,69рази ($p < 0,05$) в бронхо-альвеолярному вмісті порівняно з даними групи контролю.

Ліквідація загострення ХОЗЛ II стадії та прийом тіотропію броміду впродовж 1-го місяця супроводжується лише частковим покращанням ознак морфофункціонального стану як клітин епітеліального вистелення бронхів, так і підлеглої сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки, на тлі деякого підвищення рівнів лізоциму, sIgA та зменшенням рівня колагену IV у бронхоальвеолярному вмісті.

Прийом препарату тіотропіуму броміду терміном 2 місяці при базовому лікуванні ХОЗЛ II стадії забезпечує подальшу позитивну динаміку структурних морфологічних змін слизової оболонки бронхів (відновлення війкового апарату епітеліоцитів, нормалізацію секреторної функції келихоподібних клітин, інактивацію фібробластів, початкову дегенерацію міофібробластів) на тлі прогресуючої депресії неокологеногенезу та стабілізації рівнів лізоциму та sIgA в бронхо-альвеолярному вмісті.

Повну відсутність морфологічних ознак набряку чи дистрофії епітеліальних клітин, на фоні проявів колагенолізу в сполучній тканині власної пластинки слизової оболонки бронхів та максимального зменшення числа міофібробластів, при практично повних нормалізації рівнів колагену IV в бронхо-альвеолярному вмісті та відновленні локальних захисних бар'єрних факторів захисту (sIgA, лізоцим) ідентифіковано лише впродовж 6-ти місячного прийому тіотропію броміду пацієнтами із ХОЗЛ II стадії.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Фещенко, Ю. И.* Хроническое обструктивное заболевание легких [Текст] / Ю. И. Фещенко, Л. А. Яшина // DOCTOR. — 2004. — № 2. — С. 27–30.
2. *Наказ МОЗ України №128 від 19.03.2007* "Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Пульмонологія" [Текст].
3. *Резолюція IV з їзду фтизіатрів і пульмонологів України* [Текст]. — Київ, 2008 р.
4. *Jeffery, P. K.* Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease [Text] / P. K. Jeffery // Proc. Am. Thorac. Soc. — 2004. — № 1. — P. 176–183.
5. *Molfini, N. A., Jeffery P. K.* Chronic obstructive pulmonary disease: histopathology, inflammation and potential therapies [Text] / N. A. Molfini, P. K. Jeffery // Pulm. Pharmacol. Ther. — 2007. — Vol. 20. — P. 462–472.
6. *Hogg, J. C.* The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / J. C. Hogg [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2004. — Vol. 350. — P. 2645–2653.
7. *Haag, S.* Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts / S. Haag [et al.] // Eur. Respir. J. — 2008. — Vol. 32. — P. 555–562.
8. *Barnes, P. J.* The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease // Am. J. Med. — 2004. — Vol. 20, Suppl. 17. — P. 24S–32S.
9. *Mark Decramer, M. D.* Clinical Trial Design Considerations in Assessing Long-Term Functional Impacts of Tiotropium in COPD The UPLIFT Trial [Text] / M. D. Mark Decramer // Eur. Respir. J. — 2008. — Vol. 31. — P. 742–750.
10. *Фещенко, Ю. И.* Хронічні обструктивні захворювання легень: проблемні питання [Текст] / Ю. И. Фещенко // Нова медицина. — 2005. — № 1(18). — С. 18–20.
11. *Vincken, W.* Improved health outcomes in patients with COPD during 1 yr's treatment with tiotropium [Text] / W. Vincken [et al.] // Eur. Resp. J. — 2002. — Vol. 19. — P. 209–216.
12. *Anzueto, A.* One-year analysis of longitudinal changes in spirometry in patients with COPD receiving tiotropium [Text] / A. Anzueto [et al.] // Pulm. Pharmacol. Ther. — 2005. — Vol. 18. — P. 75–81.
13. *Racke, K.* The airway cholinergic system: physiology and pharmacology [Text] / K. Racke, S. Matthiesen // Pulm. Pharmacol. Ther. — 2004. — Vol. 17. — P. 181–198.
14. *Racke, K.* Control by cholinergic mechanisms [Text] / K. Racke, U. R. Juergens, S. Matthiesen // Eur. J. Pharmacol. — 2006. — Vol. 533. — P. 57–68.
15. *Jeffery, P. K.* Lymphocytes, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease [Text] / P. K. Jeffery // In: Chadwick D., Goode J. A., editors. Chronic obstructive pulmonary disease: pathogenesis to treatment. Chichester: John Wiley & Sons; 2001. — P. 149–168.
16. *Серов, В. В.* Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология) [Текст] / В. В. Серов, А. Б. Шехтер // Москва: Медицина, 1981. — 312 с.
17. *Roche, W. R.* Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics [Text] / W. R. Roche [et al.] // Lancet. — 1989. — Vol. 1. — P. 520–523.
18. *Gizycki, M. J.* Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma [Text] / M. J. Gizycki [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 1997. — Vol. 16. — P. 664–673.
19. *Serini, G.* Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation [Text] / G. Serini, G. Gabbiani // Exp. Cell Res. — 1999. — Vol. 250. — P. 273–283.
20. *Morishima, Y.* Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding [Text] / Y. Morishima [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 2001. — Vol. 24. — P. 1–11.
21. *Saetta, M.* CD8+ T-Lymphocytes in Peripheral Airways of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Text] / M. Saetta [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 1998. — № 3. — P. 822–826.
22. *Gizycki, M. J.* Effects of fluticasone propionate on inflammatory cells in COPD: an ultrastructural examination of endobronchial biopsy tissue [Text] / M. J. Gizycki [et al.] // Thorax. — 2002. — Vol. 57. — P. 799–803.
23. *Jeffery, P. K.* Remodeling in Asthma and Chronic Obstructive Lung Disease [Text] / P. K. Jeffery // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2001. — Vol. 164. — P. S28–S38.

ВПЛИВ БАЗОВОГО ЛІКУВАННЯ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ НА ПРОЦЕСИ МОРФОЛОГІЧНОЇ ПЕРЕБУДОВИ ТА МІСЦЕВИХ БАР'ЄРНИХ ФАКТОРІВ ЗАХИСТУ СЛИЗОВИХ ОБОЛОНОК БРОНХІВ

М. М. Островський, М. О. Кулинич-Міськів

Резюме

При ХОЗЛ вже у II стадії мають місце розлади локального захисного бар'єру та пошкодження слизової оболонки бронхів із значним розростанням сполучної тканини в її власній пластинці, що супроводжується достовірним збільшенням колагену IV та зменшенням рівнів лізоциму й sIgA в бронхо-альвеолярному вмісті. Ліквідація загострення ХОЗЛ II стадії та прийом тіотропію броміду впродовж 1-го місяця супроводжується лише частковим покращанням ознак морфофункціонального стану як клітин епітеліального вистелення бронхів, так і підлеглої сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки. Повну відсутність морфологічних ознак набряку чи дистрофії епітеліальних клітин, нормалізацію рівнів колагену IV в бронхо-альвеолярному вмісті та відновленні локальних захисних бар'єрних факторів захисту (sIgA, лізоцим) ідентифіковано лише впродовж 6-ти місячного прийому тіотропію броміду пацієнтами із ХОЗЛ II стадії.

THE INFLUENCE OF COPD MAINTENANCE THERAPY ON MORPHOLOGICAL REMODELING AND LOCAL BARRIER RESISTANCE FACTORS OF BRONCHIAL MUCOSA

M. M. Ostrovskyi, M. O. Kulynych-Miskiv

Summary

The local defense barrier disturbances and damage of bronchial mucosa with a significant growth of the lamina propria connective tissue, accompanied by significantly increased production of collagen IV and reducing lysozyme and sIgA in bronchoalveolar contents are already seen in stage II COPD. Elimination of stage II COPD exacerbation and one month treatment with tiotropium bromide led only to partial improvement of morphology and functional condition of bronchial epithelial cells and connective tissue of lamina propria. Complete resolution of signs of dystrophy or edema of epithelial cells, normalization of collagen IV level in bronchoalveolar content and restoration of local defense barrier factors (sIgA, lysozyme) was only registered after 6 months tiotropium bromide treatment of patients with II stage COPD.