

А.Л. Зашихин, Ю.В. Агафонов и А.О. Бармина

МЕХАНИЗМЫ РЕАКТИВНОСТИ ГЛАДКОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БРОНХОСПАЗМЕ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А.Л. Зашихин) Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, e-mail: zashihin2@atknnet.ru; barminastya@yandex.ru

Исследование посвящено комплексному анализу механизмов реактивности гладкой мышечной ткани (ГМТ) бронхов при развитии экспериментального бронхоспазма. Использование морфометрического, цитоспектрофотометрического и электронно-микроскопического анализа позволило выявить наличие в составе ГМТ бронхов три типа гладких миоцитов (ГМ) (малые, средние, большие), которые различаются по линейным и метаболическим параметрам. Проведенное исследование свидетельствует о том, что в условиях формирования экспериментального бронхоспазма происходит изменение соотношения ГМ в ГМТ бронхов за счет увеличения в ней доли малых клеток и элиминации больших. В динамике развития экспериментального бронхоспастического синдрома наблюдается активация цитоплазматического синтеза и синтеза ДНК преимущественно в группе малых ГМ. На субклеточном уровне отмечаются реактивно-дистрофические изменения, которые наиболее часто идентифицируются в больших ГМ, что определяет их элиминацию из популяции в динамике эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о том, что одним из важных механизмов адаптации ГМТ воздухоносных путей при развитии бронхоспазма является динамическая перестройка структуры популяции ГМ.

Ключевые слова: гладкая мышечная ткань, гладкие миоциты, бронхи, бронхоспазм, реактивность.

Несмотря на значительное число работ, посвященных изучению гладкой мышечной ткани (ГМТ) воздухоносных путей, некоторые вопросы, связанные с локальными особенностями изменений гладких миоцитов (ГМ), остаются нерешенными. Рядом исследователей получены данные о сложной структуре ГМТ, свидетельствующие о фенотипическом разнообразии ГМ [4, 7, 13] и неоднородности их популяции в составе различных внутренних органов [9, 10, 15, 18]. В последние годы появилось значительное количество работ о гетероморфии ГМ, которые различаются своими линейными параметрами, формой и составом органелл [8, 11, 12, 14]. Характер и направленность фенотипических модуляций отдельных ГМ и изменение структуры их популяции в процессе реакций адаптации остаются практически не изученными.

Цель настоящего исследования — комплексный морфологический, количественный гистохимический и электронно-микроскопический анализ реактивных изменений ГМ бронхов в динамике развития экспериментального бронхоспазма.

Материал и методы. Работа выполнена на 35 белых беспородных крысах-самцах массой 300–350 г. Бронхоспазм моделировали путем внутрибрюшинного введения аллергена (Ovalbumin, альбумин куриного яйца, ОА, grade V, Sigma Chemical, США) из расчета 100 мг/кг массы тела на 1-, 2-, 3-, 4-, 5-е сутки и ингаляционно введением 1% раствора овальбумина на 6-, 7-, 8-, 9-, 10-е сутки эксперимента в течение 15–20 мин. Материал брали на 24-, 28-, 31-, 38-, 44-е сутки от начала опыта на высоте астматического приступа. Животных

декапитировали под эфирным наркозом. Контролем служили животные, которые получали аналогичный объем изотонического раствора хлорида натрия без аллергена. Все действия с лабораторными животными осуществляли с учетом требований «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Объектом исследования была ГМТ средних и мелких бронхов.

Для получения однородной взвеси изолированных ГМ и изучения фрагментов стенок бронхов использовали оригинальный метод прицельной клеточной диссоциации [3], позволяющий избирательно выделять из стенки органов тканевые компоненты определенного типа. Полученные микрофрагменты диссоциировали в 50% водном растворе КОН в течение 2,5–3 ч. Разделения клеток достигали с помощью гидроудара струи воды из микропипетки с последующим пассажем содержимого пробирки, что позволяло получить однородную взвесь клеток, из которой готовили мазки. Выявление ДНК в ядрах проводили в строго идентичных условиях по методу Фельгена [5], контролем служили мазки, не подвергнутые гидролизу в растворе соляной кислоты. Суммарный белок цитоплазмы выявляли амидочерным 10Б [2].

Цитоспектрофотометрию проводили одноволновым методом на сканирующем спектрофотометре МФТХ-2М (Россия), оборудованным монохроматором. Определение содержания ДНК в ядрах и суммарного белка в цитоплазме проводили методом сканирования [1]. ДНК фотометрировали при длине волны 546 нм, а суммарный белок цитоплазмы — при 580 нм зондом диаметром 0,5 мкм. Одновременно определяли линейные размеры ГМ и их ядер при помощи окулярного микрометра МОВ-1-15х в двух взаимно перпендикулярных плоскостях. Объемы ГМ и их ядер вычисляли по формуле эллипсоида вращения [6].

Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) в течение 2 ч и далее — в течение 1 ч в 2% растворе OsO_4 при температуре 5 °С. Кусочки промывали в буфере, затем обезвоживали

в ацетоне возрастающей концентрации (50, 70, 90, 100%), контрастировали в 70 ° спирте 1% уранилацетатом в течение 12 ч и заливали в смесь эпона—аралдита. Для обеспечения прицельного электронно-микроскопического анализа со всех блоков получали серийные полутонкие срезы толщиной 1–2 мкм, которые окрашивали 1% раствором метиленового синего. После идентификации необходимых объектов блоки затачивали, и прицельные ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (Bromma, Швеция), подвергали двойному контрастированию в 2,5% растворе уранилацетата и 0,3% растворе цитрата свинца по E.S.Reynolds [16]. В последующем данные объекты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-100 CX (Jeol, Япония).

Все данные обрабатывали стандартными методами вариационной статистики, определяли среднюю арифметическую с ее стандартной ошибкой. Оценку статистической значимости различий полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Для получения структурно-метаболических характеристик ГМТ при развитии экспериментального бронхоспазма был проведен комплексный анализ ГМ бронхов крыс у контрольной группы животных.

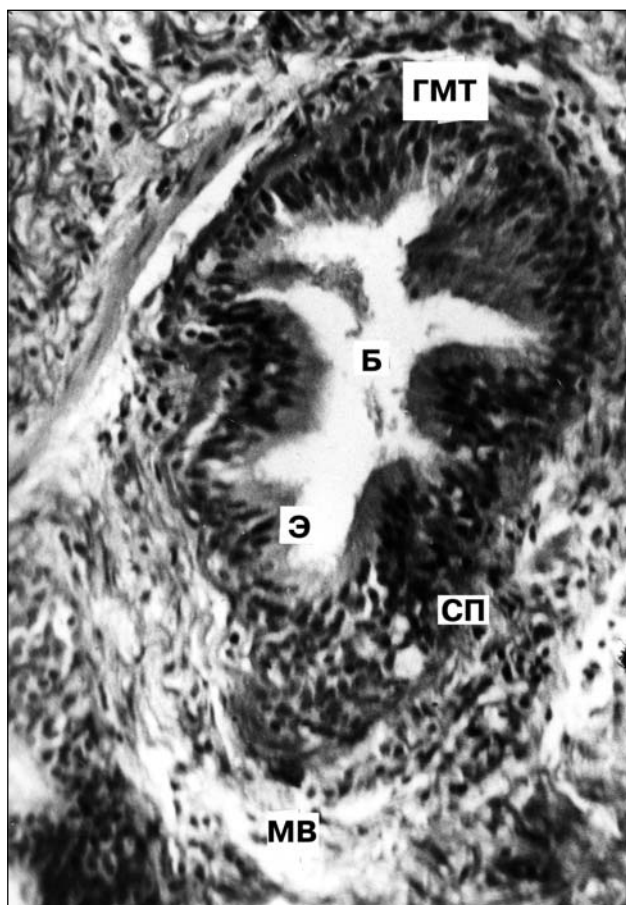


Рис. 1. Структура стенки бронха крыс при развитии бронхоспастической реакции.

Б — просвет бронха; ГМТ — гладкая мышечная ткань; Э — эпителий; СП — спазмированный участок мелкого бронха; МВ — межклеточное вещество. Об. 40, ок. 10.

Статистический анализ характера распределения ГМ по их объемам показал, что данный показатель имеет наиболее выраженный коэффициент вариации (62,74%) среди других изученных параметров. Это также подтверждается положительной величиной эксцесса (+0,62) с учетом ошибки репрезентативности и свидетельствует о гетероморфии изучаемой популяции. Анализ гистограмм распределения ГМ бронхов по объему клеток показал, что ГМТ представлена тремя типами ГМ: малыми, средними и большими, различающимися по морфометрическим параметрам, с учетом коэффициента вариации, асимметрии и эксцесса в каждой группе, значения которых соответствуют параметрам нормального распределения. Все субпопуляции клеток являются достаточно представительными, о чем свидетельствует величина ошибки репрезентативности ($P < 0,05$).

При общегистологическом исследовании легкого обнаружены вздутие альвеол, спазм ГМТ мелких бронхов (рис. 1) и закупорка их просвета слизистым секретом. Наблюдались десквамация участков эпителия слизистой оболочки бронхов, отек их стенок. Электронно-микроскопически в перибронхиальной зоне выявлялись многочисленные эозинофильные гранулоциты (рис. 2). Отчетливо выражены полнокровные сосуды под-

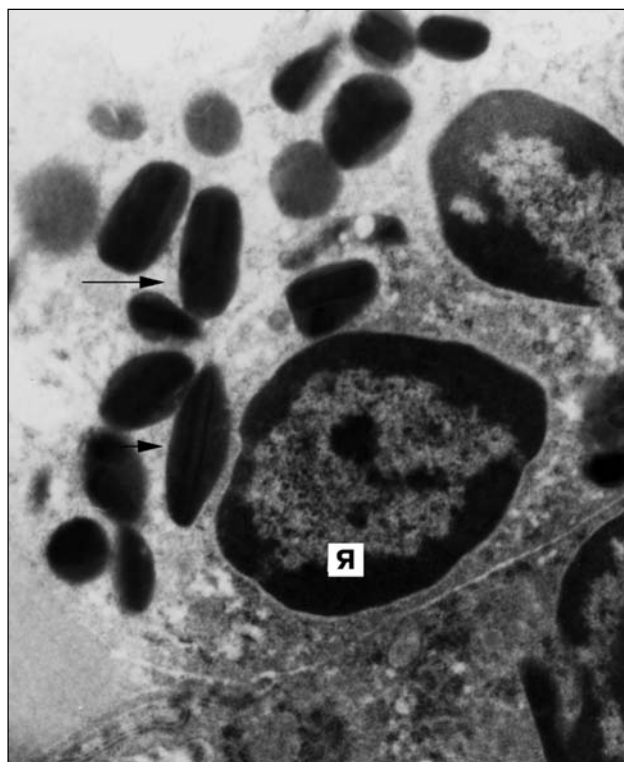


Рис. 2. Ультраструктурная организация эозинофильных гранулоцитов в гладкой мышечной ткани стенки бронха крысы.

Я — ядро; стрелки — пероксисомы. Ув. 35 000.

слизистой основы, гипертрофия и переполнение желез секретом.

Электронно-микроскопически ГМ в условиях бронхоспазма характеризуются многочисленными складками, в состав которых входят плазмолемма и базальная мембрана клетки (рис. 3).

При этом отмечается различный уровень сокращения клеток в составе пласта. Наряду с ГМ, находящимися в состоянии гиперсокращения, имеются клетки, в которых процесс контракции выражен незначительно, структура плазмолеммы практически не изменена. Определенное увеличение расстояния между соседними ГМ, вероятно, объясняется отеком межклеточного вещества. На всех этапах эксперимента в ГМТ бронхов выявляются отдельные клетки, в которых наблюдаются реактивные изменения. Наиболее часто эти явления обнаруживаются в больших ГМ с 31-х суток эксперимента. Клетки утрачивают связь с соседними ГМ, их цитоплазма характеризуется повышенной электронной плотностью, отмечается конденсация хроматина, который имеет субка-

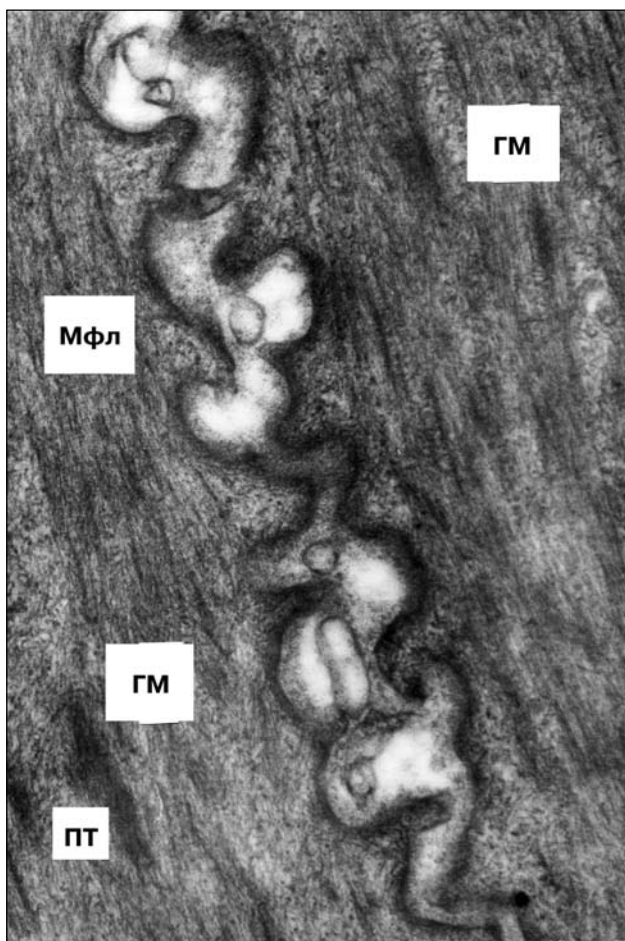


Рис. 3. Ультраструктурная организация гладких миоцитов бронхов крысы при экспериментальном бронхоспазме.

ГМ — гладкий миоцит; ПТ — плотное тельце; Мфл — миофиламенты. Ув. 35 000.

риолеммальную локализацию, ядро уменьшается в размере (рис. 4).

В цитоплазме наблюдается появление миеленоподобных фигур, свидетельствующих о дистрофических изменениях в клетке. Несмотря на определенную мозаичность данной реакции, чаще всего она имеет место в больших ГМ. Характер ультраструктурной трансформации позволяет говорить об апоптотических изменениях в этих клетках.

Анализ ГМТ бронхов в разные сроки эксперимента свидетельствует о том, что в динамике развития бронхоспазма происходит последовательное уменьшение объема ГМ бронхов от 3414 ± 150 мкм³ в контрольной группе до 2312 ± 112 мкм³ на 44-е сутки (рис. 5). Показатель ядерно-цитоплазменного отношения имеет статистически значимые изменения в течение эксперимента: уменьшается на 24-е сутки, наименьшего значения достигает на 31-е сутки ($0,0590 \pm 0,0023$), а затем медленно нарастает к концу опыта, и на 44-е сутки он имеет величину $0,0720 \pm 0,0027$.

Морфометрический подход к оценке ГМ позволил провести анализ изменения структуры популяции и дифференцированной реакции различных видов ГМ бронхов в процессе развития

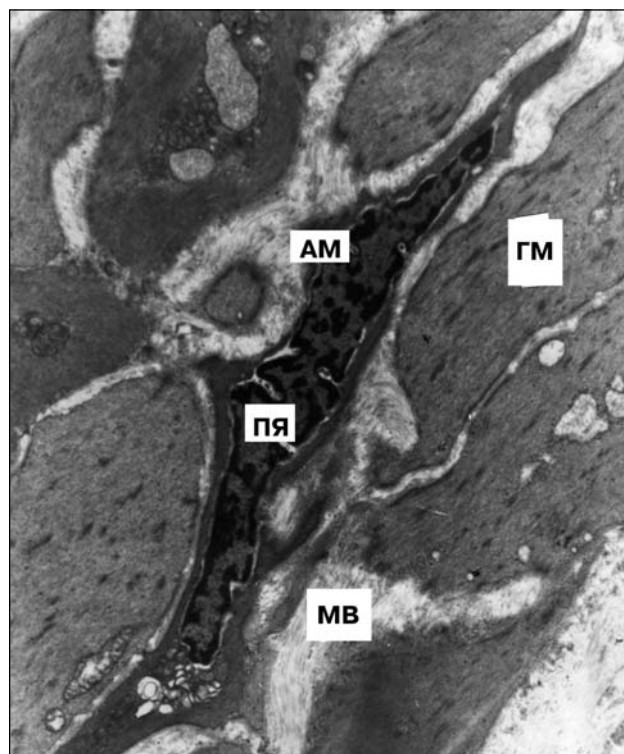


Рис. 4. Ультраструктура гладкой мышечной ткани крысы при развитии бронхоспазма.

ПЯ — пикнотизированное ядро клетки; АМ — ультраструктура апоптотически измененного ГМ. Остальные обозначения те же, что на рис. 1 и 3. Ув. 8000.

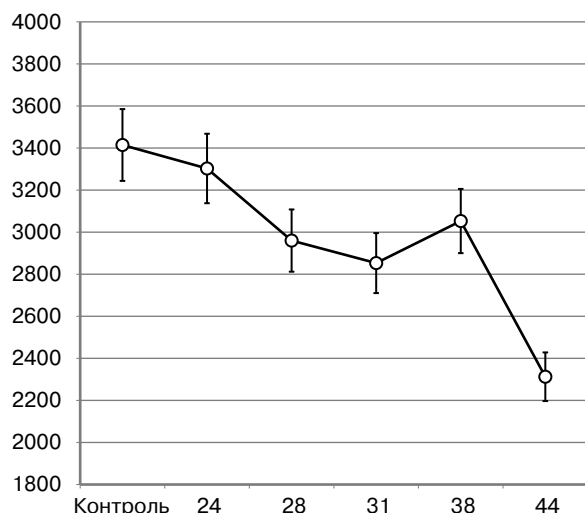


Рис. 5. Объем гладких миоцитов бронхов крысы в динамике развития бронхоспазма.

По оси абсцисс — сроки эксперимента (сут); по оси ординат — исследуемый параметр (мкм³). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

бронхоспастического состояния. Динамика соотношения различных типов клеток в составе ГМТ бронхов свидетельствует о том, что развитие бронхоспазма сопровождается изменением соотношения различных фенотипов ГМ внутри популяции в сравнении с таковым в интактной ткани (рис. 6). Выявленное уменьшение среднего показателя объема клетки в динамике эксперимента

отражает структурные изменения в популяции. Отмечается увеличение доли малых и снижение содержания средних и больших ГМ в ее составе. К концу эксперимента наблюдается тенденция к увеличению метаболической активности малых ГМ и деградации больших клеток.

Изучение содержания суммарного клеточного белка в ГМ бронхов в динамике эксперимента выявило значимое ($P < 0,05$) его увеличение во все сроки опыта по сравнению с таковым в интактном легком (рис. 7).

В ходе эксперимента выявлено увеличение количества гиперплоидных клеток и снижение доли диплоидных в ГМТ во все сроки по сравнению с контрольной группой животных (рис. 8). Дифференцированный анализ показателя плоидности свидетельствует о том, что количество гиперплоидных клеток в группах малых и средних ГМ имеет более высокий уровень на всем протяжении эксперимента, чем в интактной ГМТ бронхов.

Обсуждение полученных данных. Проведенное комплексное исследование свидетельствует о том, что в условиях формирования экспериментального бронхоспазма происходит перестройка структуры популяции ГМ за счет увеличения в ней доли малых клеток и активизации в них синтеза ДНК, что свидетельствует о возрастании пролиферативной активности. Наряду с этим, происходит последовательное уменьшение

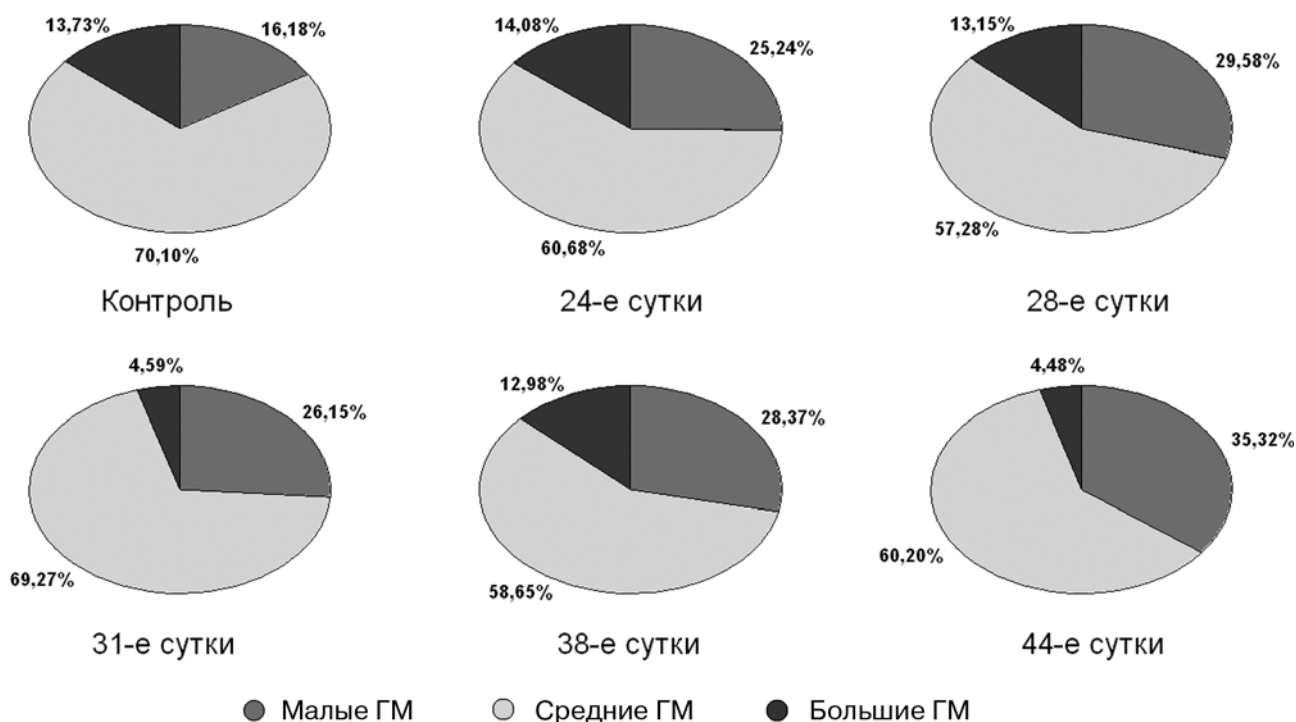


Рис. 6. Структура популяции гладких миоцитов (ГМ) бронхов крысы в разные сроки эксперимента.

средних объемов ГМ в динамике эксперимента. Гипертрофии ГМ и увеличения объема их ядер не обнаружено. Эти результаты подтверждают последние данные, полученные на материале биопсий бронхов человека [7, 13, 17] о том, что при развитии аллергической астмы у людей не развивается гипертрофии ГМ воздухоносных путей. На субклеточном уровне отмечаются реактивно-дистрофические изменения, которые наиболее часто идентифицируются в больших ГМ, что определяет их элиминацию в динамике эксперимента. Светооптически и электронно-микроскопически обнаружена эозинофильная перибронхиальная инфильтрация. Эти данные не противоречат современным представлениям [7, 8, 12] о том, что реактивно-измененные ГМ бронхов при развитии астматических состояний способны синтезировать ряд цитокинов (ИЛ-5, ИЛ-13), инициирующих активность эозинофильных гранулоцитов. Ультраструктурный анализ показал, что одним из механизмов клеточной гибели на поздних стадиях эксперимента является апоптоз.

Полученные в ходе экспериментальной работы данные свидетельствуют о том, что одним из важных механизмов адаптации ГМТ воздухонос-

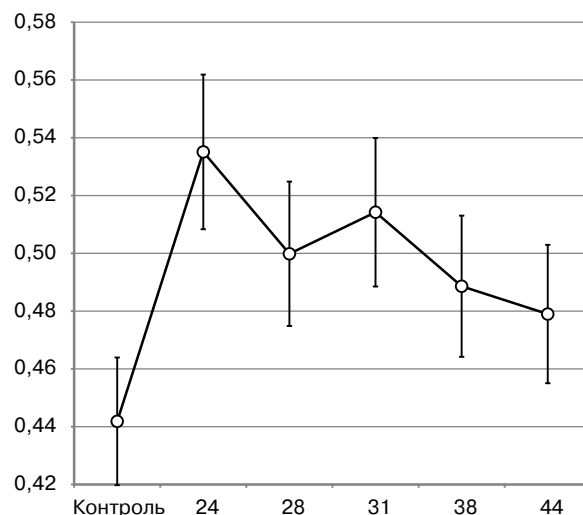


Рис. 7. Содержание суммарного белка цитоплазмы гладких миоцитов бронхов крысы в разные сроки эксперимента.

По оси абсцисс — сроки эксперимента (сут); по оси ординат — оптическая плотность белков (отн. ед). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

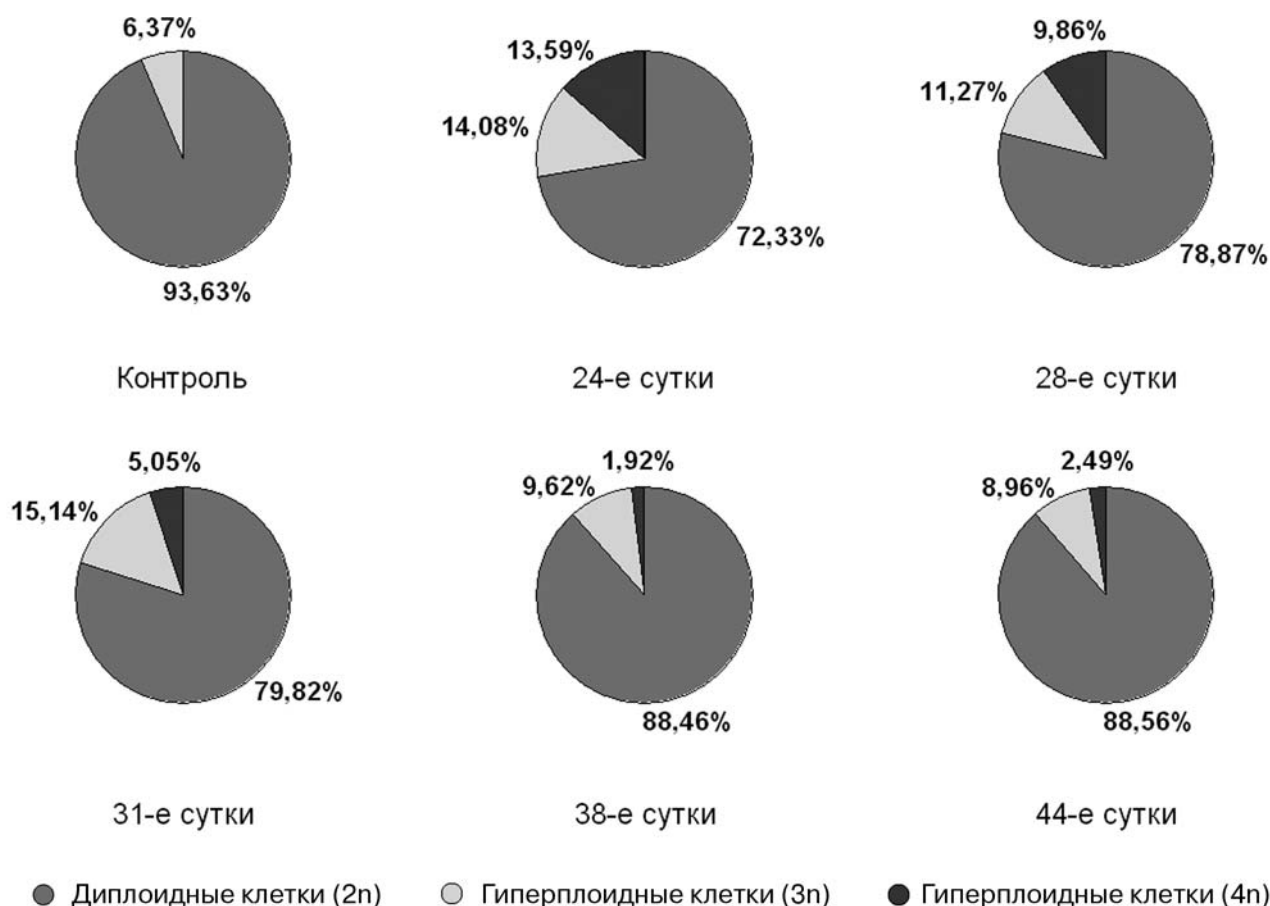


Рис. 8. Структура плоидности гладких миоцитов бронхов крысы в динамике эксперимента.

ных путей при развитии бронхоспазма является динамическая перестройка структуры клеточной популяции. Реакция на тканевом уровне осуществляется за счет пролиферативных процессов, усиливающихся по мере удлинения сроков эксперимента, а нарастающее по частоте состояние гиперсокращения является повреждающим фактором, который вызывает реактивно-дистрофические изменения преимущественно в группе больших ГМ. Данный тип клеток мы рассматриваем как терминальное звено миобластического дифферона, что, вероятно, определяет их пониженную резистентность к значительным функциональным нагрузкам при бронхоспазме.

ЛИТЕРАТУРА

- Агроскин Л.С. и Папаян Г.В. Цитофотометрия. Л., Наука, 1977.
- Брумберг В.А. и Певзнер Л.З. Использование амидочерного в цитофотометрическом исследовании клеточных протеинов. Цитология, 1972, т. 14, № 5, с. 674–676.
- Зашихин А.Л., Агафонов Ю.В. и Лисишников Л.В. Патент РФ на изобретение № 2104524 от 23.05.1994 г. «Способ получения препаратов изолированных клеток».
- Зашихин А.Л. и Селин Я. Висцеральная гладкая мышечная ткань. Архангельск, Умеа, изд. СГМУ, 2001.
- Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., Изд-во иностр. лит-ры, 1962.
- Хесин Я.Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. М., Медицина, 1967.
- Barnes P.J. and Cosio M.G. Cells and mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Eur. Respir. Monograph, 2006, v. 38, p. 130–158.
- Doherty T. and Broid D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. Curr. Opin. Immunol., 2007, v. 19, № 6, p. 676–680.
- Gabella G. Development of visceral smooth muscle. Results Probl. Cell Differ., 2002, v. 38, p. 1–37.
- Giuriato L.E., Chiavegato A. and Pauletto P. Correlation between the presence of an immature smooth muscle cell population in tunica media and the development of atherosclerotic lesion. A study on different-sized rabbit arteries from cholesterol-fed and Watanabe heritable hyperlipemic rabbits. Atherosclerosis, 1995, v. 116, № 1, p. 77–92.
- Groves G., Wang Z. and Newman W.H. Two distinct phenotypes of rat vascular smooth muscle cells: growth rate and production of tumor necrosis factor—alpha. Am. Surg., 2005, v. 71, № 7, p. 546–550.
- Halayko A.J. and Amrani Y. Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodelling in asthma. Respir. Physiol. Neurobiol., 2003, v. 137, p. 209–222.
- Halayko A.J. and Solway J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. J. Appl. Physiol., 2001, v. 90, p. 358–368.
- Halayko A.J., Stelmack G.L. and Yamasaki A. Distribution of phenotypically disparate myocytes subpopulations in airway smooth muscle. Can. J. Physiol. Pharmacol., 2005, v. 83, p. 104–116.
- Neylon C.B., Avdonin P.V. and Dilley R.J. Different electrical responses to vasoactive agonists in morphologically distinct smooth muscle cell types. Cir. Res., 1994, v. 75, № 4, p. 733–741.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 1963, v. 17, p. 208–212.
- Woodruff P.G., Dolganov G.M., Ferrando R.E. et al. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 2004, v. 169, p. 1001–1006.
- Zashikhin A.L. and Agafonov J.V. Allergen induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs: the characteristic feature of smooth muscle population. Allergy, 1996, v. 51, № 32, p. 194.

Поступила в редакцию 24.06.09
Получена после доработки 16.09.09

REACTIVITY MECHANISMS OF AIRWAY SMOOTH MUSCLE TISSUE IN EXPERIMENTAL BRONCHIAL SPASM

A.L. Zashikhin, Yu.V. Agafonov and A.O. Barmina

This investigation was aimed at the complex evaluation of the reactivity mechanisms of bronchial smooth muscle tissue (SMT) in experimental bronchial spasm. Morphometric, cytospectrophotometric and electron microscopical analysis demonstrated the presence of three types of smooth muscle cells (SMC) within the bronchial SMT (small, medium, large), that differed in their linear and metabolic parameters. The findings of this study indicate that under the conditions of experimental bronchial spasm development, the ratios of SMC in bronchial SMT are changed with the increase in proportion of small SMC and the elimination of large SMC. In the dynamics of experimental bronchial spasm development, the activation of cytoplasmic synthesis as well as of DNA synthesis was detected mainly in group of small SMC. The reactive–dystrophic changes were marked at the subcellular level, that were most often identified in large SMC resulting in their elimination from population in the dynamics of an experiment. The data obtained suggest that one of the important mechanisms of airway SMT adaptation to the bronchial spasm development is a dynamic reorganization of SMC population.

Key words: *smooth muscle tissue, smooth muscle cells, bronchi, bronchial spasm.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Northern State Medical University, Arkhangelsk.