

Цитологические критерии воздействия гипоксии при местных воспалительных процессах в легких

Г.Г.Кругликов, В.Б.Суслов, Л.М.Лихачева, Н.Б.Странжа, А.П.Эттингер

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований, Москва (директор — проф. А.П.Эттингер)

В условиях воспаления и гипоксии деструктивные процессы отмечают во всех клетках аэрогематического барьера, базальных мембранах и в интерстиции. Основой патологических процессов в клетках с коротким жизненным циклом и долгоживущих являются нарушения энергетического обмена в митохондриях. Структурно-функциональные особенности долгоживущих клеток способствуют большей устойчивости к кислородной недостаточности. Увеличение числа пойкилоцитов среди эритроцитов в альвеолярных капиллярах может служить одним из индикаторов местной гипоксии.

Ключевые слова: воспаление, гипоксия, митохондрии, эритроциты

Cytologic Criteria of Hypoxia Influence in Local Inflammatory Processes in the Lung

G.G.Kruglikov, V.B.Suslov, L.M.Likhatcheva, N.B.Stranzha, A.P.Oettinger

Pirogov Russian National Research Medical University, Institute for Fundamental and Applied Biomedical Research, Moscow (Director — Prof. A.P.Oettinger)

In the conditions of inflammation and hypoxia the destructive processes are noted in all cells of the air-blood barrier, basement membranes and in the interstitium. The basis of pathological processes in cells with short and long lives cycles are violations of the energy metabolism in mitochondria. Structural and functional characteristics of long-living cells promote the greater resistance to oxygen deficiency. The increase in the number of poikilocytes among red blood cells in the alveolar capillaries may serve as an indicator of local hypoxia.

Key words: inflammation, hypoxia, mitochondria, erythrocytes

Исследования в области нарушения кровообращения и последующего воздействия гипоксии — одна из основных задач фундаментальной и клинической медицины. Воспалительные хронические процессы в легких развиваются под воздействием множества факторов, в том числе от инородных частиц (включая нанометрового диапазона), поступающих в воздух при производственных процессах, плохой экологии, табакокурения, микрофлоры и т.д. [1, 2]. В результате этого возникают такие заболевания в легких, как пневмокониозы, хронические обструктивные болезни легких, астма, туберкулез [3].

При патологии легких основное внимание уделяется структуре и функции респираторных отделов — ацинусам, а в них — аэрогематическим барьерам (АГБ) альвеол. Процесс альтерации нарушает все структуры АГБ, включая сосуды микроциркуляторного русла, и изменяет их метаболизм [4].

Клеточный состав очагов воспаления весьма разнообразен, клетки различаются происхождением, продолжительностью жизни, размерами, структурой и функцией, особенностью регенерации и т.д.

Среди факторов, определяющих воспалительный процесс, важнейшее значение имеет сосудистая патология [5, 6]. Нарушение местного кровообращения в виде венозного полнокровия, явления стаза в кровеносных капиллярах, экссудации плазмы и лейкоцитов в интерстиций и альвеолы, замедления лимфооттока приводит к гипоксии ткани и ухудшению снабжения кислородом клеток, т.е. к клеточной гипоксии. Нормальное поступление кислорода в клетки необходимо для окислительного фосфорилирования и выработки энергии. Это особенно важно для фагоцитирующих и короткоживущих клеток [7].

Однако в связи с ограниченными возможностями световой микроскопии самые ранние начальные патологические

Для корреспонденции:

Кругликов Герман Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела электронной микроскопии НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-4174
E-mail: oett@rsmu.ru

Статья поступила 02.07.2013, принята к печати 29.10.2013

процессы изучены недостаточно. К ним относятся трансудация белков плазмы крови в альвеолярные полости и замещение ими сурфактантного комплекса, разрыхление и отек базальных мембран и интерстиция, деструкция митохондрий в клетках АГБ, отложение молодых коллагеновых фибрилл в АГБ барьере, развитие аутоиммунного защитного механизма и мерокриновая секреция цитокинов клетками очага воспаления.

Целью данного исследования было выявление начальной патологии в клетках при местном воздействии гипоксии методом электронной микроскопии, имеющим высокую разрешающую способность и являющимся фундаментом изучения современной патологии.

Материалы и методы

Экспериментальное воспаление — пневмокоиозы — моделировали на белых крысах введением через трахею в легкие в дозе 50 мг/мл мелкодисперсных образцов размером частиц 5 мкм и менее каменного угля, кварца, цеолита, лунного грунта, доставленного на землю советскими автоматическими станциями «Луна-16» и «Луна-20». Материалы забирали через 1–2, 5, 7, 14 сут; 1, 3, 5 мес от начала эксперимента в группах от 16 до 40 животных.

Препараты легких изучали методом световой микроскопии после окраски срезов гематоксилином и эозином для общей оценки патологического процесса и пикрофуксином для оценки интенсивности фиброза при увеличении 300.

Цитологический и ультраструктурный анализ проводили на полутонких срезах и методом электронной микроскопии. Материал для электронной микроскопии готовили по стандартной методике и заключали в эпоксидную смолу «Аралдит», срезы получали на ультрамикротоме LKB-3 (Швеция). Исследовали ультратонкие срезы на микроскопе HU-12 (Hitachi, Япония) при увеличении 4000–15 000.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспериментальный подход и моделирование пылевых болезней легких (пневмокоиозов) позволяют изучать патологические процессы в динамике, от экссудативной фазы до фиброзирования ткани, в том числе в АГБ. Интра-трахеальное введение в легкие пылевых частиц нарушает местное кровообращение, включаются все защитные механизмы, особенно фагоцитоз макрофагами разрушенных клеток и инородных частиц. Цитоплазма их может достигать гигантских размеров, например, при поглощении 10 эритроцитов и более. Фагоцитоз инородных частиц вызывает гипертрофию органелл и особенно лизосом, фаголизосом, которые заполняют всю цитоплазму. Процесс поглощения частиц требует много энергии, поэтому возле фаголизосом концентрируются митохондрии.

Процесс фагоцитоза остается незавершенным, фагоцит разрушается, следующий макрофаг вновь фагоцитирует, и так далее следует продолжение процесса. Гибель фагоцитов обусловлена отсутствием в лизосомах ферментов, способных переваривать минеральные частицы. В фагоцитах кислород, поступающий в клетки, стимулирует выработку активных форм, которые обладают бактерицидными свой-

ствами, но на инородные частицы (кварц, цеолиты, уголь, лунный грунт) они не действуют, более того, разрушают клетки. Прежде всего наступает деструкция митохондрий, они набухают, разрушаются кристы, матрикс просветляется (обедненный окислительными ферментами). Постепенно отечная жидкость заполняет органеллы, и они превращаются в вакуоли. Пылевые частицы обладают цитотоксичностью, макрофаги интенсивно разрушаются, поэтому восполнение их в очаге воспаления происходит не только дифференцировкой из моноцитов, но и путем митотического деления. Под влиянием гипоксии разрушаются короткоживущие клетки, в том числе редко встречающиеся тучные.

Клетки крови, сгущенная плазма переполняют микрососуды, вены, капилляры, и кровоток замедляется. В эндотелиальных клетках капилляров происходит концентрация немногочисленных органелл в зоне ядра, а в удлинённых отростках цитоплазмы — перемещение пиноцитозных пузырьков сквозь базальную мембрану в цитоплазму альвеолоцитов I типа. Цитоплазма альвеолоцитов I типа резко истончается, становится нитевидной, фенестрированной, местами прерывается, и базальная мембрана оголяется, т.е. возрастает проницаемость АГБ (рис. 1, а, б). В области таких дефектов на поверхности альвеол в отечной жидкости концентрируются электронноплотные зернистые массы белковой природы и фибриновые волокна с характерной поперечной исчерченностью. Выявление фибриновых волокон в альвеолярных полостях служит морфологическим признаком замещения сурфактантного комплекса высокомолекулярными белками плазмы крови, т.е. развития отека в газообменной структуре и нарушения газообмена, дефицита поступления кислорода в альвеолярные капилляры, развития гипоксии.

В альвеолоцитах I типа, сохранивших свою структуру, присутствовал и другой способ транспорта плазмы на альвеолярную поверхность, — образованием крупных пузырей на апикальной поверхности и последующим отрывом.

Альвеолоциты II типа также включены в защитные реакции дыхательной поверхности альвеол. В начале воспалительного процесса они интенсивно синтезируют и секретируют пластинчатые тельца на поверхность альвеолярной выстилки, где тельца раскручиваются и в виде мембран сурфактантного комплекса покоятся на жидкой гипофазе. Клетки II типа богаты крупными митохондриями, обеспечивающими энергией интенсивный синтез белковых мембран пластинчатых телец. Однако постепенно митохондрии теряют кристы, ферменты матрикса замещаются отечной жидкостью, которая также накапливается в цитоплазме, и происходит десквамация клеток (рис. 1, в, г). Сурфактант замещается трансудатом, нарушающим газообмен. Патологические процессы захватывают и другие клетки, например долгоживущие гладкомышечные клетки в стенках артериол. В цитоплазме гладких миоцитов можно наблюдать деструкцию части митохондрий и превращение их в вакуоли, заполненные отечной жидкостью. В цитоплазме отечная жидкость пропитывает миофиламенты, они разрыхляются, и промежутки между ними увеличиваются, что затрудняет сократительную функцию. Но митохондрии гладких миоцитов обладают значительной лабильностью, например, позволяют обеспечивать энергией процессы гипертрофии в мышечной оболочке артерий и в миометрии при беременности.

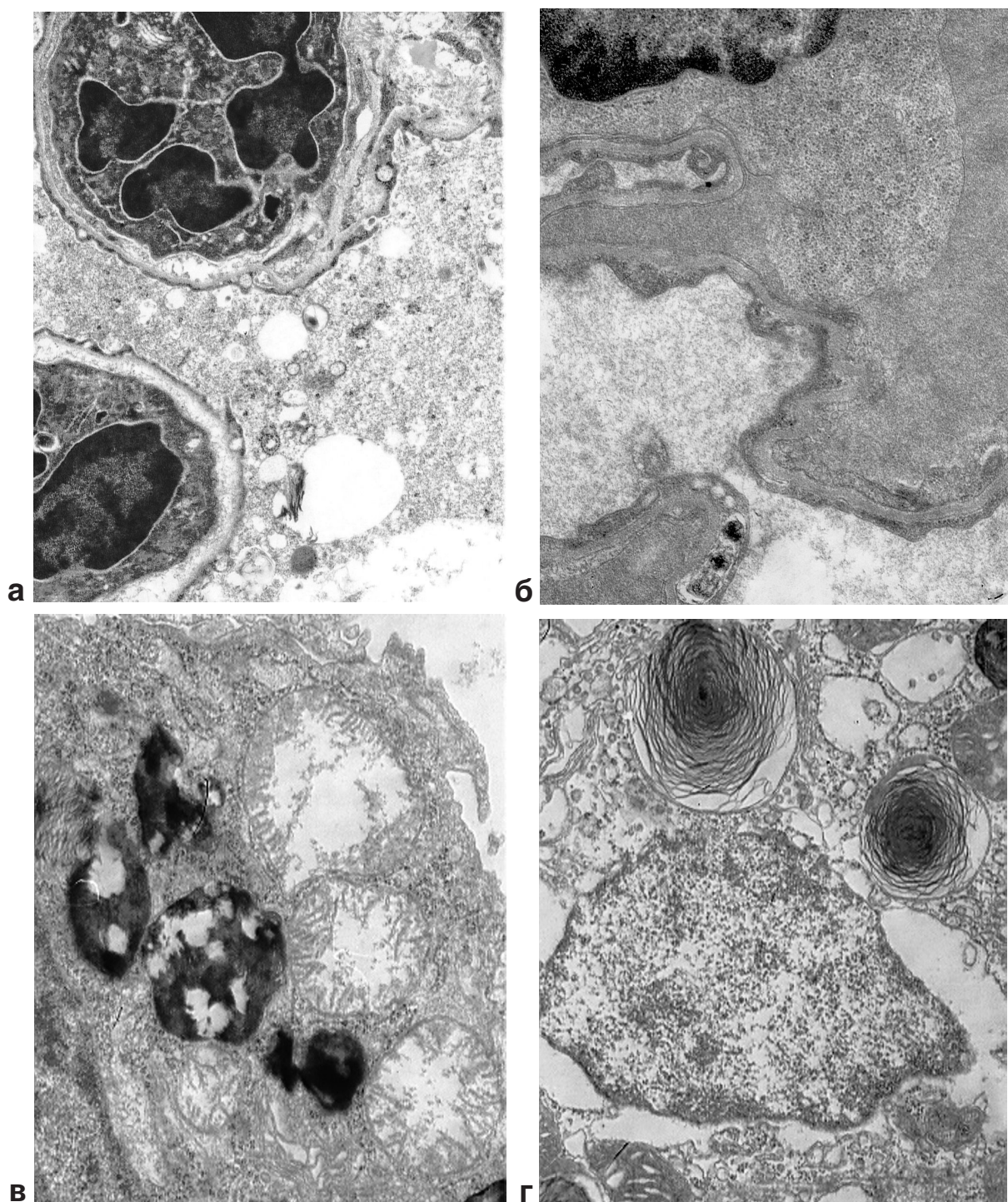


Рис. 1. Деструкция АГБ при гипоксии: а — полость альвеолы заполнена серозной жидкостью, деструкция альвеолоцитов I типа и эндотелия капилляров; б — интенсивный отек альвеол, вакуолизация альвеолоцита I типа; в — альвеолоцит II типа, отек митохондрий, разрушение крист, деструкция пластинчатых телец; г — альвеолоцит II типа, отек цитоплазмы; разрушение хроматина в ядре.

В условиях отека происходит утолщение базальных мембран АГБ под воздействием пропитывания серозной жидкостью и ухудшение транспорта кислорода в кровь и интерстиции.

Недостаток кислорода в очаге воспаления способствует разрушению фагоцитирующих макрофагов, выделению ими факторов активации фибробластов и фиброзированию ткани. Отложение коллагеновых волокон непосредственно в АГБ нарушает газообмен и усиливает местную гипоксию. Данный механизм лежит в основе последнего этапа патогенеза пневмокозиозов, а интенсивность указанных событий определяет тяжесть патологического процесса.

Снижение концентрации кислорода при гипоксии вызывает морфологические изменения также в эритроцитах, вышедших в межклеточное пространство и находящихся в капиллярах.

По периферии эритроцитов в результате выхода молекул гемоглобина образуются очень мелкие отверстия (рис. 2, а–г). Внутри сосудов часто встречаются сфероциты, пойкилоциты и плазмолеммы лизированных эритроцитов (тени). Увеличение числа пойкилоцитов

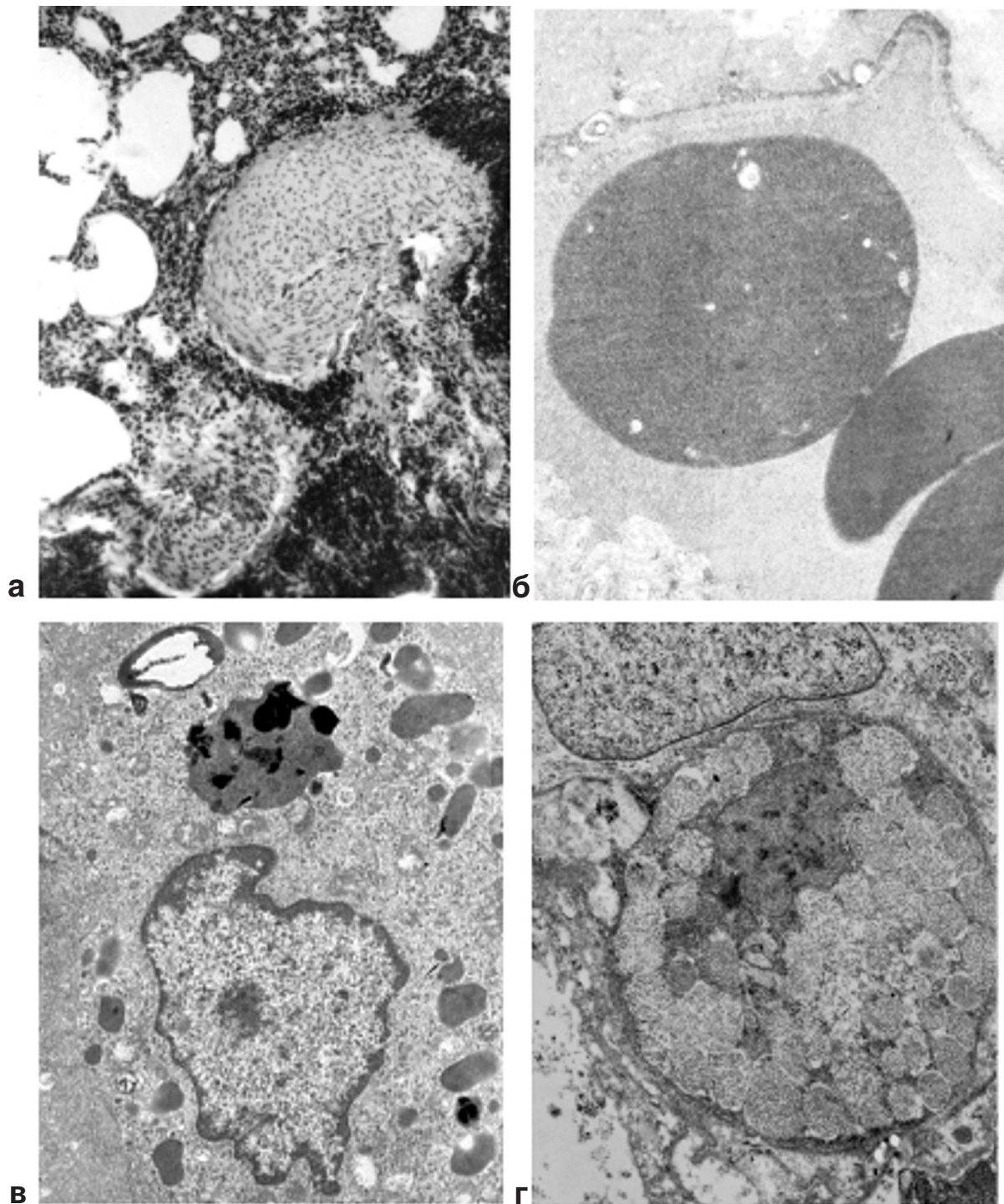


Рис. 2. Патология клеток в очаге воспаления и при гипоксии: а — резкая гипертрофия мышечной оболочки артерии; б — кровеносный капилляр АГБ, частичное разрушение эндотелия, в эритроците образование микрополостей под плазмолеммой; в — альвеолярный макрофаг, крупная фаголизосома с микрочастицами угля, множество мелких лизосом и митохондрий с разрушенными кристами и отеком; г — тучная клетка в процессе разрушения, опустошение специфических гранул, кариолизис.

в капиллярах в условиях замедления кровотока, стаза и сгущения плазмы может служить маркерным показателем дефицита поступления кислорода.

Действие гипоксии на клетки неоднозначно. Клетки, имеющие короткий клеточный цикл (одиночные, малого размера — лейкоциты, макрофаги, плазмоциты, эритроциты), страдают в большей степени по сравнению с долгоживущими клетками (гладкими миоцитами, эндотелием, альвеолоцитами I типа, нейронами и т.д.). Это свя-

зано с тем, что у короткоживущих клеток не происходит внутриклеточной регенерации органелл. Выполнив свою функцию (фагоцитоз, активацию фибробластов, секрецию антител и цитокинов), они погибают в результате апоптоза — физиологического процесса разрушения. Макрофаги, разрушающиеся под воздействием фагоцитированных частиц, стимулируют коллагеногенез фибробластами — это последний защитный механизм при деструктивных процессах [4].

Обновление популяции короткоживущих клеток происходит за счет новообразования в органах кроветворения. Клетки, живущие долгие годы, поддерживают свое постоянство (гомеостаз) внутриклеточной регенерацией на молекулярном уровне, а также развитым цитоскелетом, повышенным содержанием митохондрий и кальция, фиксацией к базальным мембранам, синхронностью функционирования как единой структуры, формируя сложные контакты, особенно щелевые [8]. Одним из основных критериев оценки структурно-функционального состояния клеток в условиях воспаления и гипоксии является ультраструктура митохондрий. Важный признак патологии митохондрий — снижение электронной плотности матрикса в связи с утратой окислительных ферментов, необходимых для выработки энергии. Другой критерий — это разрушение крист и сокращение их площади в сравнении с матриксом, чем меньше крист, тем меньше базирующихся на них элементарных частиц, в которых происходит синтез АТФ. Деструктивные митохондрии накапливают отечную жидкость и превращаются в вакуоли.

Эритроциты наиболее чувствительны среди клеток к недостатку кислорода, поэтому их патология может служить индикатором гипоксии. Исследования поверхности эритроцитов при токсической анемии методом сканирующей электронной микроскопии также выявили экзоцитоз молекул гемоглобина [9].

Заключение

Энергия митохондрий поддерживает функционирование клеток в норме и при воспалении и гипоксии.

При фагоцитозе цитотоксических инородных частиц короткоживущими клетками (макрофагами и лейкоцитами) в них происходят патологические изменения и деструкция митохондрий, что вызывает апоптозное разрушение клеток. Красный костный мозг восполняет их потери по принципу обратной связи. Долгоживущие формы — эндотелий, альвеолоциты, гладкие миоциты, имеющие большие размеры, значительное число органелл, особенно митохондрий, функционирующие единой системой, — более адаптированы к клеточной гипоксии.

Необратимую патологию митохондрий характеризуют разрушение и снижение количества крист с элементарными частицами (субстрата синтеза АТФ), замещение матрикса бедной белками отечной жидкостью и формирование вакуолей, развитие внутриклеточного отека, гибель клеток.

Наличие макрофагов с фагоцитированными инородными частицами, но лишенных митохондрий, по-видимому, свидетельствует об окончании их жизненного цикла.

Повышение числа пойкилоцитов среди эритроцитов может служить еще одним объективным проявлением отрицательного влияния гипоксии. Однако такие эритроциты

не учитываются при гематологическом анализе, так как микродефекты лежат за пределами разрешающей способности светооптической микроскопии.

Литература

1. Величковский Б.Т. Экологическая пульмонология. Екатеринбург, 2003. 139 с.
2. Величковский Б.Т., Кругликов Г.Г. Дискуссионные вопросы о влиянии частиц нанометрового диапазона на органы дыхания // Пульмонология. 2011. №3. С.5–8.
3. Чучалин А.Г. Актуальная пульмонология // Пульмонология. 1996. №3. С.7–10.
4. Кругликов Г.Г., Суслов В.Б., Лихачева Л.М. и др. Структурные особенности хронических воспалительных реакций в легких // Вестн. РГМУ. 2012. №6. С.58–62.
5. Bonetti P.O., Lerman L.O., Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003. V.23 (2). P.168–175.
6. Кароли Н.А., Ребров А.П. Эндотелиальная дисфункция и ее клиническое значение у больных хронической обструктивной болезнью легких // *Клин. мед.* 2005. №9. С.10–16.
7. Кругликов Г.Г., Суслов В.Б., Эттингер А.П. Субклеточные механизмы развития воспалительных реакций // Вестн. РГМУ. 2011. №2. С.58–61.
8. Саркисов Д.С., Втюрин Б.В. Электронно-микроскопический анализ повышения выносливости сердца. М.: Медицина, 1969. 171 с.
9. Arutjunov V.D., Batsura Ju.D., Gribova I.A., Kruglikov G.G. Scanning electron-microscopic and light-optic investigations of erythrocytes in toxic anaemia // *Br J Ind Med.* 1981. V.38 (1). P.72–75.

Информация об авторах:

Сулов Владимир Борисович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-6429
E-mail: suslov_vb@mail.ru

Лихачева Лидия Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-6429
E-mail: likhachyova37@mail.ru

Странжа Наталья Борисовна, младший научный сотрудник отдела электронной микроскопии НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-6429
E-mail: stranza@mail.ru

Эттингер Александр Павлович, доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-1401
E-mail: oett@rsmu.ru