

УДК 57.086.3:616.233+616.248+616-092.4

**А.К. Загорулько, Т.А. Аскар, А.А. Загорулько, А.Н. Самойлов**  
**КОМПЛЕКСНАЯ ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ**  
**УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЭПИТЕЛИЯ БРОНХИОЛ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ**  
**В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского*

В последние годы при изучении морфологических изменений, возникающих при бронхиальной астме (БА), все большее внимание исследователей привлекают мелкие воздухоносные пути (бронхиолы) с диаметром менее 2 мм [9]. Установлено, что ряд характерных для БА изменений (воспалительная инфильтрация, накопление слизи, утолщение стенки воздухоносных путей) имеют место не только в проксимальных, но и в дистальных, мелких воздухоносных путях [3, 8]. Между тем, в изучении морфологических изменений дистальных воздухоносных путей при БА имеется ряд существенных трудностей. В частности, исследовать морфологические изменения в бронхиолах у живых пациентов с БА не представляется возможным, поскольку взятие биопсийного материала может быть осуществлено лишь из более или менее крупных бронхов, а на результаты изучения аутопсийного материала оказывают влияние изменения либо посмертного характера, либо изменения дистальных воздухоносных путей, имеющие место у погибших пациентов, но не связанные с БА [2, 5, 6, 7]. Более того, даже при изучении ультраструктурных изменений в бронхиолах в условиях экспериментальной БА преимущественно используется какой-либо один метод, чаще трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), что, на наш взгляд, не позволяет в полной мере правильно оценить возникающие изменения из-за чрезвычайно малого объема исследуемого материала.

В этой связи целью настоящего исследования явилась комплексная электронномикроскопическая (с использованием ТЭМ и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)) оценка изменений ультраструктуры эпителия бронхиол при БА в эксперименте.

#### **Материал и методы исследования**

Материалом для исследования послужили дистальные воздухоносные пути (бронхиолы) диаметром менее 2 мм, выделенные из легких 10 белых крыс, у которых БА моделировали по методу, описанному J. De Bie et al. [1]. Животные подвергались декапитации под тиопенталовым наркозом на 28-й день от начала эксперимента. В качестве контроля использовали материал, полученный из легких 5 здоровых белых крыс, содержащихся в сходных с опытными животными условиях в виварии Крымского государственного медицинского университета.

Немедленно после выделения бронхиол из легких материал помещали в 1,4 % раствор глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН = 7,2–7,4). После окончания фиксации в течение 1 суток на холоде (+4 °С) из бронхиолы вырезали кусочки в продольном и поперечном направлениях размерами, соответственно, 5 × 2 мм и 2 × 2 мм, которые затем согласно общепринятой методике, готовили сначала для СЭМ с выс-

шиванием материала в критической точке и последующим напылением углерода в SEM Coating System 508 Evaporation PSU. Материал просматривали и фотографировали в электронном микроскопе Scan. Micr. JEOL SC 35 (Япония).

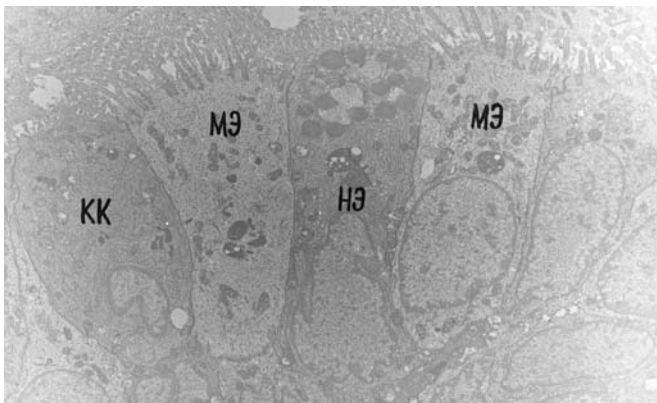
Для дальнейшего ТЭМ исследования этого же самого материала использовали оригинальную разработанную нами методику, суть которой состояла в следующем: кусочки ткани после СЭМ исследования помещали в фосфатный буфер с вышеуказанным рН на 1 сутки при комнатной температуре. Затем осуществляли дофиксацию материала в 1 % растворе четырехоксида осмия с последующим обезвоживанием и заключением в эпоксидные смолы согласно общепринятым методикам. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме "Reichert" (Австрия), просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEOL-1010 (Япония). Таким образом была получена возможность изучения топографически одного и того же материала одновременно ТЭМ и СЭМ методами, что, в свою очередь, сделало возможным произвести комплексную электронномикроскопическую оценку состояния ультраструктурной организации бронхиолярного эпителия при БА в эксперименте.

Всего было изготовлено 20 блоков, из которых получено 45 сеточек с ультратонкими срезами, окрашенными уранилацетатом и по Рейнольдсу. Методом СЭМ исследовано 12 образцов.

#### **Результаты исследований и обсуждение**

В контрольных наблюдениях при ТЭМ респиаторные бронхиолы были выстланы однослойным цилиндрическим мерцательным эпителием, между клетками которого встречались клетки Клара и нейроэндотелиальные клетки (рис. 1). Поверхность реснитчатых клеток, обращенная в просвет бронхиолы, содержала регулярно и параллельно расположенные реснички длиной 5–10 мкм и толщиной 0,1–0,2 мкм с небольшим количеством микроворсинок между ними (рис. 2). Основное количество митохондрий с умеренно плотным матриксом и параллельными кристами располагалось в апикальной части клеток. Цитоплазматическая сеть и пластинчатый комплекс были выражены незначительно. Встречались свободно расположенные рибосомы, лизосомы, тонофибриллы и отдельные электронноплотные гранулы. Цитоплазма имела среднюю электроннооптическую плотность и была гомогенной. Ядра клеток овальные, круглые со сравнительно светлой кариоплазмой и обычно одним ядрышком типичного вида. Межклеточные контакты плотные с образованием в апикальной части боковых поверхностей клеток терминальных десмосом.

Расположенные между реснитчатыми клетками клетки Клара имели куполообразную форму с отсутствием ресничек на апикальной поверхности и наличием митохондрий и цитоплазматической сети



**Рис.1.** Эпителий респираторной бронхиолы. МЭ — мерцательный эпителий; КК — клетка Клара; НЭ — нейроэндотелиальная клетка; Р — реснички. ТЭМ. Ув. 3000

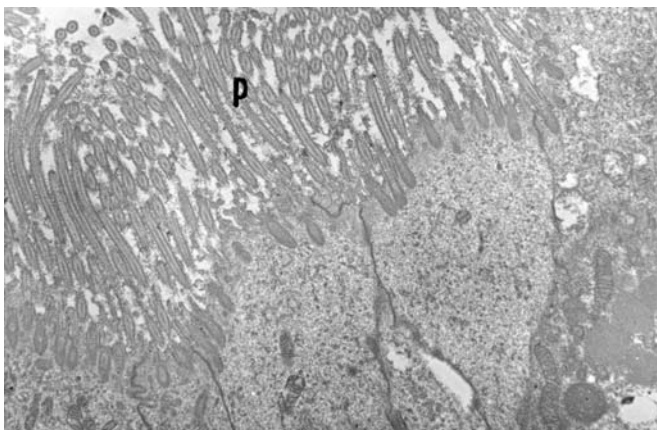
преимущественно в базальной части, а в апикальной — электронноплотных гранул. В цитоплазме также присутствовали комплекс Гольджи, множественные пузырьки и мультивезикулярные тельца.

Единичные нейроэндотелиальные клетки содержали в своей цитоплазме электронноплотные гранулы.

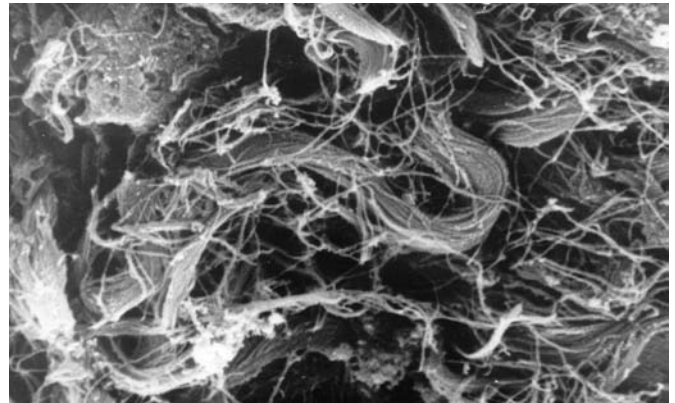
При СЭМ обращала на себя внимание однонаправленность параллельно расположенных ресничек эпителия, присутствие на поверхности бронхиол единичных капелек слизи и практически отсутствие складчатости слизистой. Просвет бронхиол выглядел равномерным. В единичных наблюдениях в нем определялось наличие одиночных макрофагов, лимфоцитов и других клеточных элементов.

В опытных наблюдениях при ТЭМ, наиболее типичным проявлением изменений со стороны клеток мерцательного эпителия бронхиол являлись изменения ресничек. Чаще всего нарушалось их регулярное расположение с уменьшением их общего количества. Оставшиеся реснички имели разный угол наклона к клеточной поверхности и разную длину, что было особенно заметно при СЭМ (рис. 3). Многие реснички выглядели набухшими, имели волнистую наружную мембрану и иногда были похожи на теннисные ракетки. Утраченные реснички замещались неправильными по форме цитоплазматическими выростами, в которых достаточно часто отмечались разрывы плазмалеммы с проникновением содержимого клеток в просвет бронхиол.

Как правило, при ТЭМ не удавалось обнаружить складчатости слизистой оболочки, а скопления клеточных



**Рис.2.** Регулярное расположение параллельных ресничек (Р) на апикальной поверхности клетки мерцательного эпителия. ТЭМ. Ув. 6000

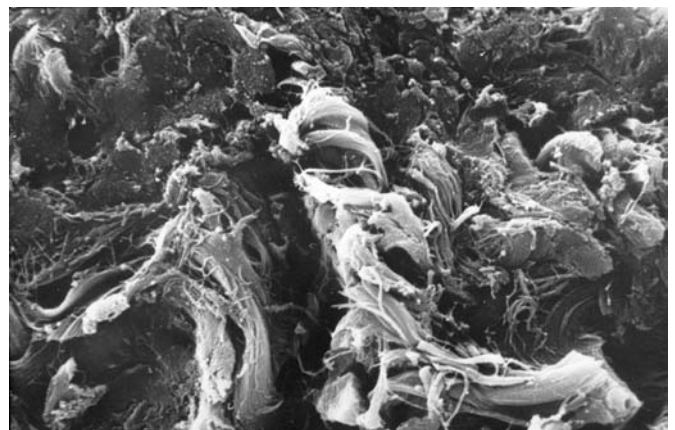


**Рис.3.** Хаотичное расположение ресничек на эпителиальной поверхности в условиях моделированной бронхиальной астмы. СЭМ. Ув. 4800

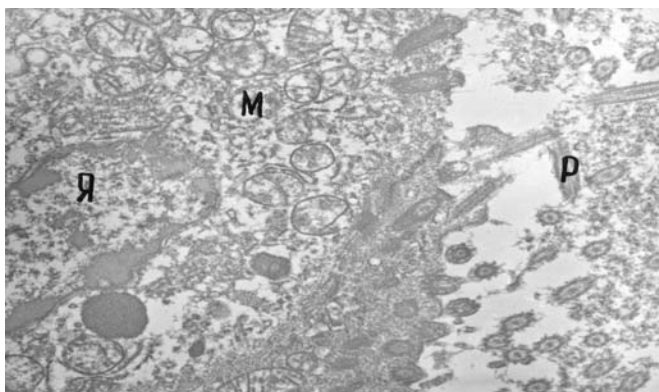
элементов и их отломков в просвете бронхиол встречались относительно редко, что связано в небольшой площади среза. В отличие от ТЭМ, при СЭМ в опытных наблюдениях почти всегда обнаруживалась выраженная в той или иной мере складчатость слизистой оболочки с глубокими "впадинами" и валикообразными возвышениями, чередующиеся друг с другом (рис. 4). В большинстве случаев при этом в разных участках бронхиол были видны скопления слизи с примесью большего или меньшего количества клеток (макрофаги, лимфоциты, лейкоциты) и/или нитей фибрина. Обращало на себя внимание также расширение контактов между эпителиальными клетками.

Между тем, как при ТЭМ, так и при СЭМ мы обнаруживали проникновение вышеназванных клеток между клетками эпителия бронхиол лишь в единичных случаях.

Результаты ТЭМ также свидетельствовали о нарушении ультраструктурной организации эпителиальных клеток и внутриклеточных органелл. В частности, в митохондриях имело место просветление матрикса с редукцией и дискомплексацией крист, отмечалось расширение профилей канальцев цитоплазматической сети с уменьшением количества рибосом в гранулярной части (рис. 5). Кое-где в надъядерной зоне реснитчатых клеток обнаруживались аутофагосомы. Ядра многих эпителиальных клеток приобретали неправильную форму с фестончатыми краями, а количество хроматина в них уменьшалось, что сопровождалось разрежением центральной части кариоплазмы и конденсацией глыбок хроматина вблизи ядерной мембраны.



**Рис. 4.** Выявленная складчатость слизистой бронхиолы с глубокими "впадинами" и валикообразными возвышениями. СЭМ. Ув. 30000



**Рис. 5.** В митохондриях (М) клеток мерцательного эпителия бронхиолы имеет место просветление матрикса, редукция и дисконкомплексация крист. Я.- ядро; Р - реснички. ТЭМ. Ув. 10000

Сходные изменения имели место в клетках Клара, в которых отмечалось разрыхление цитозоля с потерей гомогенности цитоплазмы и появлением участков различной электронной плотности. Изменения со стороны ядер и других внутриклеточных органелл были сходными с таковыми в реснитчатых клетках.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при экспериментальной БА в ультраструктурной организации бронхиолярного эпителия имеется ряд изменений, затрагивающих как, в первую очередь, реснитчатый аппарат эпителия, так и строение внутриклеточных органелл реснитчатых клеток и клеток Клара. Обнаруживаемые при ТЭМ эти дистрофические и деструктивные изменения, по-видимому, являются следствием возникающего при БА воспаления, затрагивающего не только крупные бронхи, но и бронхиолы. Воспалительную инфильтрацию бронхиолярного эпителия клетками, которые часто обнаруживаются в более крупных воздухоносных путях при БА (макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки), удается выявить далеко не всегда. Вместе с тем, параллельное использование СЭМ для анализа имеющихся в бронхиолах изменений, позволяет выявить ряд характерных особенностей, прежде всего в виде скоплений слизи с примесью клеточных элементов и фибрина в просвете бронхиол. По-видимому, их появление является следствием ретроградного заноса и аспирации из более крупных воздухоносных путей, что может быть связано с нарушением бронхиолярного клиренса из-за деструктивных изменений реснитчатого аппарата мерцательного эпителия, хотя нельзя исключить, что отчасти они являются результатом дистрофических и деструктивных изменений самих эпителиальных клеток. Кроме того, сочетание применения ТЭМ и СЭМ позволило установить, что как и в более проксимальных воздухоносных путях, в мелких бронхиолах при экспериментальной БА имеют место явления бронхиолярного спазма, проявляющиеся в виде выраженной складчатости слизистой. Вероятно, такая бронхиолярная констрикция связана не только со спазмом гладкомышечных элементов, но и с нарушениями находящегося в бронхиолах сурфактанта, возникающими, в том числе, в связи с нарушениями в клетках Клара, синтезирующих один из сурфактант-ассоциированных белков (SP-A). Это предположение подтверждается исследованиями [4], свидетельствующими о том, что при нарушениях в бронхиолярном сурфактанте даже обычный тонус гладкомышечных элементов может сопровождаться бронхиолоспазмом, поскольку

стабильность бронхиолярного просвета почти на 50 % обеспечивается поверхностноактивными свойствами сурфактанта.

**Заключение**

Сочетанное применение ТЭМ и СЭМ дает возможность более полно и объективно оценить изменения, возникающие в дистальных воздухоносных путях при экспериментальной БА. Анализ ультраструктурных изменений в бронхиолярном эпителии при этой патологии свидетельствует о важной роли таких изменений в патогенезе БА, что требует поиска новых эффективных путей их коррекции на основе более глубоких морфофункциональных исследований.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. *Absence of Late Airway Response Despite Increased Airway Responsiveness and Eosinophilia in a Murine Model of Asthma* / J.J. de Bie, M. Kneepkens, A.D. Kraneveld et al. // *Exper.Lung Research.* — 2000. — Vol. 26. № 7. P. 491–507.
2. *Carroll N., Cooke C., James A.* The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways in asthmatics. // *Eur. Respir. J.* — 1997. — Vol. 10. — P. 292–300.
3. *Cellular infiltration of the airways in asthma of varying severity* / M. Synek, R. Beasley, A.J. Frew et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1996. — Vol. 154. — P. 224–230.
4. *Hohlfeld J.M.* Surfactant in the Airways: Composition, Function and Relevance in Asthma // In: *Appl. Cardiopulm. Pathophysiol.* — 2000. — Vol. 9. — № 3. — P. 246–248.
5. *Inflammation in small airways in asthma* / Q. Hamid, Y. Song, T.C. Kotsimbos et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 1997. — Vol. 100. — P. 44–51.
6. *Jeffery P.K.* The Development of Large and Small Airways. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1998. — Vol. 157. — P. S174–S180.
7. *Lung immunopathology in cases of sudden asthma death* / J.L. Faul, C. Tormey, C. Leonard et al. // *Eur. Respir. J.* — 1997. — Vol. 10. — P. 301–307.
8. *Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma* / M. Saeta, A.D. Stefano, C. Rosina et al. // *Am. J. Respir. Dis.* — 1991. — Vol. 143. — P. 138–143.
9. *W.R. Roche.* Inflammatory and Structural Changes in the Small Airways in Bronchial Asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1998. — Vol. 157. — P. S191–S194.

**КОМПЛЕКСНАЯ ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЭПИТЕЛИЯ БРОНХИОЛ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**А.К. Загорулько, Т.А. Аскарю, А.А. Загорулько, А.Н. Самойлов**

**Резюме**

Ультраструктура эпителия бронхиол 15 белых крыс с моделированной бронхиальной астмой была изучена с использованием методов трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сочетание применения трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии дает возможность более полно и объективно оценить изменения, возникающие в дистальных воздухоносных путях при экспериментальной бронхиальной астме.

**COMBINED ELECTRON MICROSCOPIC EVALUATION OF ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF BRONCHIOLAR EPITHELIUM IN EXPERIMENTAL BRONCHIAL ASTHMA**

**A.K. Zagoroulo, T.A. Askary, A.A. Zagoroulo, A.N. Samoilov**

**Summary**

The ultrastructure of bronchiolar epithelium of 15 white rats with modeled bronchial asthma was studied using transmission and scanning electron microscopy methods. The received data have shown that combined use of transmission and scanning electron microscopy helped to estimate the changes in distal airways in experimental asthma more completely and objectively.