

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАПИЛЛЯРОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ БРОНХОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ФЕНОТИПАХ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Елена Андреевна ГЕРЕНГ, Ирина Владимировна СУХОДОЛО, Раиса Ивановна ПЛЕШКО, Людмила Михайловна ОГОРОДОВА, Людмила Ивановна ВОЛКОВА, Полина Александровна СЕЛИВАНОВА, Анна Николаевна ДЗЮМАН

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава,
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

Целью исследования явилось установление морфологических признаков эндотелиальной дисфункции сосудов слизистой оболочки бронхов у пациентов с различными клиническими вариантами тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмы. С помощью гистологических, электронно-микроскопических и морфометрических методов исследования установлено, что «brittle» фенотип тяжелой бронхиальной астмы отличается усилением секреторных процессов эндотелиоцитов и активацией трансапикалярного обмена, а гемодинамические нарушения при хронической астме с фиксированной обструкцией сопровождаются развитием периваскулярного фиброза и редукцией капиллярного русла.

Ключевые слова: ультраструктура бронхов, эндотелиальная дисфункция, капилляры.

Тяжелая неконтролируемая форма бронхиальной астмы (БА) — значительная медико-социальная проблема из-за высокой стоимости малоэффективного лечения, снижения трудоспособности и смертности этой категории больных [1, 2].

Полиморфизм тяжелой астмы и контроль за ее течением во многом зависят от структурных нарушений слизистой оболочки бронхов и входящих в ее состав сосудов [3, 4]. Дебютом гемоциркуляторных расстройств при тяжелой неконтролируемой БА выступает эндотелиальная дисфункция, которая, являясь одним из компонентов ремоделирования бронхов, усугубляет дыхательную недостаточность, гипоксемию и гипоксию тканей [3, 5].

Несмотря на достижения в изучении структурной дезорганизации бронхиальной стенки, морфологическая основа вазорегуляторных расстройств, реализуемых в бронхиальном дереве у пациентов с астмой, остается малоизученной.

Цель данной работы — установить морфологические признаки эндотелиальной дисфункции сосудов слизистой оболочки бронхов у пациентов с различными клиническими вариантами тяжелой неконтролируемой БА.

Материалы и методы

Проведено одномоментное сравнительное исследование пациентов обоего пола с тяжелой формой БА «brittle» фенотипа ($n = 12$) и хронической астмой с «фиксированной бронхиальной

обструкцией» ($n = 10$) в возрасте от 28 до 62 лет ($54,3 \pm 8,22$ лет). Длительность заболевания составила $9,89 \pm 5,12$ лет. В контрольную группу вошли некурящие лица без патологии органов дыхания ($n = 6$). Пациенты с БА, на момент включения в исследования, находились в стационаре, вне обострения и соответствовали следующим критериям отбора: 1) «brittle» фенотип БА: наличие суточной вариабельности пиковой скорости выдоха с амплитудой $> 40\%$ в течение более 50% времени за 5-месячный период наблюдения, на фоне максимально интенсивного лечения с применением высоких доз ингаляционных кортикостероидов и β_2 -агонистов длительного действия; 2) фенотип «астма с фиксированной обструкцией»: постоянная персистенция симптомов БА, низкие показатели функции внешнего дыхания (объем форсированного выдоха $\leq 60\%$ от должного, пиковой скорости выдоха менее 60% от должного) с эпизодами внезапного ухудшения, требующими системной терапии глюкокортикостероидами (50–20 мг/сут по преднизолону в течение не менее 6 месяцев) или без них.

До проведения любых процедур, связанных с данным исследованием, получено письменное информированное согласие от каждого больного (одобрено локальным комитетом по этике ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава г. Томска № 877 от 10.11.2008).

Геренг Е.А. — к.м.н. доцент кафедры морфологии, e-mail: e-gereng@mail.ru

Суходоло И.В. — зав. кафедрой морфологии, д.м.н., проф., e-mail: suhodolo@sibmail.com

Плешко Р.И. — д.м.н., проф. кафедры морфологии, e-mail: raisap57@mail.ru

Огородова Л.М. — д.м.н., проф., член корр. РАМН, заслуженный деятель науки, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Волкова Л.И. — зав. кафедрой внутренних болезней педиатрического факультета, д.м.н., проф., e-mail: volkova@mail.ru

Селиванова П.А. — ассистент кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины, e-mail: pselivanova@mail.ru

Дзюман А.Н. — к.м.н., доцент кафедры морфологии, e-mail: dzyman@vtomske.ru

С целью получения образцов бронхов всем больным и лицам контрольной группы выполняли бронхофиброскопию по стандартной методике гибким фиброскопом (BF1T20, Olympus Corporation, Япония) [1]. Биоптаты слизистой оболочки бронхов (2–3 фрагмента) забирали методом щипковой биопсии из среднедолевого бронха правого легкого. Для светооптического исследования фрагменты слизистой оболочки бронхов фиксировали в 10% забуференном формалине в течение суток, обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин по стандартной методике. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином-эозином. Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 4% растворе параформальдегида, дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия, дегидратировали в этиловых спиртах восходящей концентрации и заключали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме «Ultratome III» (LKB, Швеция). Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали 1% раствором азура II и исследовали под световым микроскопом. Ультратонкие срезы толщиной 60–100 нм контрастировали 2% раствором уранилацетата и цитратом свинца. Препараты просматривали в электронном микроскопе «JEM-100 CXII» (JEOL, Япония). Морфометрическое исследование осуществляли с использованием компьютерной программы ImageJ 3.16. С помощью метода точечного счета Автандилова в собственной пластинке слизистой оболочки рассчитывали удельный объем соединительной ткани, объемную плотность капилляров, плотность сосудов с явлениями стаза и тромбоза ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$). На электронных микрофотографиях в эндотелиоцитах подсчитывали объемную плотность микропиноцитозных везикул (МПВ) ($\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$), удельный объем секреторных гранул (%), их диаметр (нм), ядерно-цитоплазматическое отношение (отношение удельного объема ядра к объему клетки) (ЯЦО) [6].

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0. с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представляли в виде медианы (Me), меру рассеивания — в виде квартильного интервала ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$) [7].

Результаты и обсуждение

При бронхоскопическом исследовании у всех больных «brittle» фенотипом тяжелой астмы констатировали наличие хронического катарального эндобронхита с морфологическими

признаками гиперсекреции и дистонии среднедолевого бронха. Хроническая астма с «фиксированной бронхиальной обструкцией» отличалась развитием катарально-склеротической или атрофической формы бронхита. Изменения деформации бронхов, бронхоэктатические образования не обнаружены.

Собственная пластинка слизистой оболочки бронхов у лиц контрольной группы представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с небольшим количеством капилляров, удельная плотность которых составляла $0,22$ ($0,20$ – $0,31$) $\text{мм}^3/\text{мм}^3$. Ультроструктурное исследование показало, что капилляры слизистой оболочки бронхов (СОБ) выстланы эндотелиоцитами типичного строения, на люминальной поверхности которых определялись единичные МПВ, в цитоплазме — одиночные секреторные гранулы, по ультроструктурным признакам соответствующие тельцам Вейбеля — Палади (табл.). ЯЦО в эндотелиоцитах лиц контрольной группы составляло $0,30$ ($0,28$ – $0,34$).

При гистологическом исследовании бронхобиоптатов у пациентов с тяжелой формой БА «brittle» фенотипа, в отличие от контроля, нами выявлен периваскулярный отек, разволокнение коллагеновых волокон, полнокровие сосудов собственной пластинки слизистой оболочки, что подтверждается данными морфометрии (табл.).

Ультроструктурное исследование капилляров СОБ у пациентов с тяжелой формой БА «brittle» фенотипа продемонстрировало набухание эндотелиоцитов капилляров и увеличение ЯЦО в них ($p = 0,0003$). Люминальная поверхность имела неровный рельеф с признаками клазматоза, часто образовывала большое количество мелких пиноцитозных инвагинаций. По всей цитоплазме эндотелиальных клеток наблюдали множество светлых полиморфных МПВ, удельный объем которых был выше аналогичных показателей в контрольной группе. Ядра эндотелиоцитов овальной или бобовидной формы с неровными контурами в связи с множественными выростами нуклеолеммы, маргинальная компактизация хроматина (рис. 1). Часто определялись признаки внутриклеточного отека, что сопровождалось «набуханием» митохондрий, просветлением их матрикса, исчезновением крист, отеком и расширением цистерн эндоплазматического ретикулума и пластинчатого комплекса Гольджи. Такие капилляры не содержали форменных элементов крови, в их эндотелиоцитах присутствовали единичные электронно-плотные секреторные гранулы,

Таблица

Морфометрическая характеристика капилляров собственной пластинки слизистой оболочки бронхов у пациентов с различными клиническими фенотипами тяжелой формы бронхиальной астмы, Ме (Q0,25–Q0,75)

Исследуемые показатели	Тяжелая форма бронхиальной астмы		Контрольная группа, n = 6
	Фенотип «brittle», n = 12	Фенотип хроническая астма с «фиксированной бронхиальной обструкцией», n = 10	
Объемная плотность соединительной ткани (мм ³ /мм ³)	0,33 (0,26–0,40) ♦	0,46 (0,42–0,56) ●	0,31 (0,25–0,38)
Объемная плотность капилляров (мм ³ /мм ³)	0,48 (0,36–0,57) *, ♦	0,35 (0,18–0,32)	0,22 (0,20–0,31)
Объемная плотность сосудов с признаками стаза и тромбоза (мм ³ /мм ³)	0,18 (0,24–0,34) *, ♦	0,24 (0,20–0,31) ●	0,03 (0,02–0,05)
Объемная плотность микропиноцитозных везикул (мкм ³ /мкм ³)	0,26 (0,18–0,39) *, ♦	0,16 (0,12–0,24)	0,17 (0,16–0,20)
ЯЦО	0,51 (0,43–0,63) *	0,53 (0,46–0,60) ●	0,30 (0,28–0,34)
Удельный объем секреторных гранул Вейбеля-Палади, %	12,85 (10,38–14,52) *, ♦	24,19 (19,09–26,52) ●	3,04 (2,35–4,26)
Диаметр телец Вейбеля — Палади, нм	543,99 (478,42–613,15) *, ♦	429,94 (392,96–469,66) ●	267,43 (200,24–356,8)

Примечание: n — количество пациентов; * — достоверность различий ($p < 0,05$) при сравнении параметров контрольной группы и пациентов с «brittle» фенотипом; ● — достоверность различий ($p < 0,05$) параметров контрольной группы и пациентов с хронической астмой с постоянной бронхиальной обструкцией; ♦ — достоверность различий ($p < 0,05$) при сравнении параметров у пациентов с «brittle» фенотипом и астмой с постоянной бронхиальной обструкцией.

диаметр которых был достоверно ($p = 0,0008$) выше аналогичных показателей в контрольной группе (табл.). Электронно-плотные гранулы Вейбеля — Паладе располагались в безъядерной зоне, при этом выявлялись как тельца с плотной фибриллярной структурой, так и образования, заполненные большим количеством мелких ориентированных по длине и заключенных в плотный матрикс цитоплазматических трубочек (рис. 1). Эти гранулы, по данным Wilson J.W. et al. [4], содержат фактор фон Виллебранда и Р-селектин. Удельный объем телец Вейбеля — Паладе достоверно ($p = 0,0006$) превышал показатели в контрольной группе (табл.).

СОБ при хронической астме с фиксированной обструкцией характеризовалась выраженным периваскулярным фиброзом с утолщением и уплотнением коллагеновых волокон собственной пластинки слизистой оболочки. Это подтверждается данными морфометрии: так, у больных хронической астмой с фиксированной обструкцией объемная плотность соединительной ткани и количество сосудов с признаками стаза, сладжа, тромбоза была достоверно ($p = 0,0007$) выше показателей как в контрольной группе, так при нестабильной форме БА «brittle» фенотипа (табл.).

В СОБ пациентов хронической астмой с фиксированной обструкцией отмечалось сужение просвета капилляров в связи с выраженным периваскулярного фиброза. Стенки сосудов имели признаки истончения, нередко разрывы. Эндотелиоциты представлены двумя популяциями клеток: одни были увеличены в размере, их ультроструктура соответствовала «светлым»

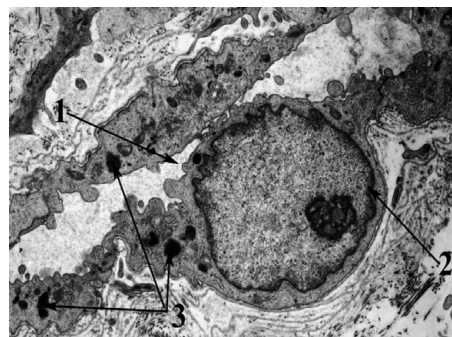


Рис. 1. Фрагмент кровеносного капилляра собственной пластинки слизистой оболочки бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы «brittle» фенотипа. Сужение просвета и запустевание капилляра (1). Гипертрофия эндотелиоцита, мелкие инвагинации нуклеолеммы эндотелиальной клетки (2). Множественные тельца Вейбеля-Паладе и микропиноцитозные везикулы (3). Ув. 6200.

эндотелиоцитам, которые определялись в капиллярах СОБ у пациентов с тяжелой формой БА фенотипа «brittle». Другие эндотелиальные клетки были уменьшены в размерах, уплощены, их цитоплазма представлялась сгущенной, электронноплотной (рис. 2). В то же время перинуклеарно в «темных» эндотелиоцитах выявлялось большое количество вакуолей и секреторных гранул. В просвет сосуда выдавалась только их ядросодержащая часть, ядра имели неровные контуры, хроматин был конденсирован и располагался в виде глыбок, преимущественно по периферии, вдоль нуклеолеммы. Базилярная поверхность таких эндотелиоцитов, как правило, была ровной, тогда как люминальная содержала небольшое число мелких темных МПВ, их объемная плотность была достоверно ($p = 0,0006$) снижена по сравнению с показателями у пациентов с тяжелой формой БА «brittle» фенотипа (табл.). В обменной зоне «светлых» и «темных» эндотелиоцитов у пациентов с хронической астмой с фиксированной бронхиальной обструкцией количество телец Вейбеля—Паладе было увеличено, размеры их—уменьшены, они отличались выраженным полиморфизмом, некоторые из них имели вытянутую, неправильную форму и электронно-прозрачное содержимое.

Согласно современной концепции, тяжелая форма БА отличается патоморфологическим и патогенетическим полиморфизмом, что обуславливает клиническую гетерогенность заболевания [2]. Действительно, оказалось, что при «brittle» фенотипе и хронической астме с фиксированной обструкцией происходят качественные и количественные изменения капилляров, формирующие сосудистый компонент ремоделирования бронхов.

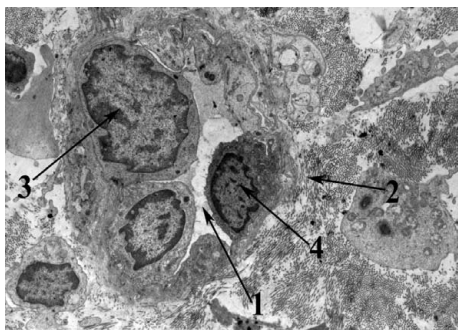


Рис. 2. Кровеносный капилляр собственной пластинки слизистой оболочки бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы фенотипа «хроническая астма с фиксированной обструкцией». Деформация просвета сосуда (1). Периваскулярный фиброз (2). Крупные «светлые» эндотелиоциты (3). Мелкие «темные» эндотелиальные клетки (4). Ув. 3600.

При нестабильной форме БА «brittle» фенотипа в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов наблюдается изменение просвета капилляров за счет «набухания» эндотелиоцитов с увеличением ядерно-цитоплазматического отношения. Округление эндотелиоцитов мелких сосудов, по мнению некоторых авторов, служит проявлением их повышенного тонуса, направленного на поддержание капиллярного кровотока и активацию транскапиллярного обмена [1, 3]. Интенсификация процессов микровезикулярного транспорта в эндотелиоцитах капилляров обычно документируется увеличением объемной плотности МПВ, содержащих факторы активации, которые регулируют сосудистую проницаемость, реологические свойства крови, гемостаз [3, 5]. Возможно, обнаруженные нами у пациентов с «brittle» фенотипом БА ультраструктурные признаки эндотелиальной дисфункции приводят к усилению воспалительных процессов с активацией вне- и внутриклеточного отека и развитию неконтролируемой бронхиальной гиперреактивности.

Ультраструктурно капилляры СОБ при хронической астме с фиксированной обструкцией характеризовались уменьшением диаметра и повышением объемной плотности телец Вейбеля—Паладе. Это может свидетельствовать об усилении продукции фактора фон Виллебранда и Р-селектина, которые активизируются при повреждении стенки сосуда и играют важную роль в формировании гемодинамических нарушений и усилении свертывающей системы крови [4, 5]. У пациентов с хронической формой астмы с фиксированной обструкцией это нашло свое отражение в повышении удельного объема сосудов с ультраструктурными признаками реологических расстройств (стаз, сладж, тромбоз), приводящих к нарушению перфузии через микрососуды, блокаде транскапиллярного обмена и дистрофическим изменениям эндотелиальных клеток.

Капилляротрофическая недостаточность, проявлением которой является уменьшение объемной плотности МПВ, сопровождается фиброзом собственной пластинки слизистой оболочки бронхов и у пациентов с этим типом БА, безусловно, усиливает гипоксию. Редукция истинных капилляров и периваскулярный фиброз являются доминантными патоморфологическими признаками данной нозологической формы астмы и играет ключевую роль в бронхоконстрикции и бронхиальной гиперреактивности.

Заключение

«Brittle» фенотип тяжелой БА отличается усилением секреторных процессов эндотелиоцитов и активацией трансапиллярного обмена, а гемодинамические нарушения при хронической астме с фиксированной обструкцией сопровождаются развитием периваскулярного фиброза и редукцией капиллярного русла.

Список литературы:

1. Непомнящих Г.И. Биопсия бронхов: морфогенез общепатологических процессов в легких. М., 2005. 405 с.

Непомнящих Г.И. Biopsy of bronchial tubes: morphogenesis of general pathological processes in lungs. М., 2005. 405 p.

2. Огородова Л.М., Козина О.В., Геренг Е.А. Участие метаболитов NO в регуляции аллергического воспаления и их вклад в ремоделирование слизистой оболочки бронхов у больных бронхиальной астмой // Рос. аллергол. журн. 2009. (5). 11–17.

Ogorodova L.M., Kozina O. V, Gereng E.A. NO metabolites impact on allergic inflammation regulation

and their contribution to remodeling bronchi mucous in bronchial asthma patients // Ros. allergol. zhurn. 2009. (5). 11–17.

3. Фисенко В. Сосудистый компонент ремоделирования при бронхиальной астме и эффекты лекарственных средств // Врач. 2007. (1). 17–19.

Fisenko V. Vascular component of remodeling at a bronchial asthma and effects of medical products // Vrach. 2007. (1). 17–19.

4. Wilson J.W., Hii S. The impotence of the microvasculature in asthma // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2006. 6. 51–55.

5. Chetta A., Zanini A., Foresi A. et al. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodeling in asthma // Clin. Exp. Allergy. 2005. 35. 1437–1442.

6. Автандилов Г. Г. Диагностическая медицинская плоидометрия. М.: Медицина, 2006. 192 с.

Avtandilov G.G. Diagnostic medical ploidometry. М.: Meditsina, 2006. 192 p.

7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA. М., 2002. 305 с.

Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. Application of applied programs STATISTICA. М., 2002. 305 p.

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF CAPILLARIES OF A MUCOUS MEMBRANE OF BRONCHI AT VARIOUS CLINICAL PHENOTYPES OF A HEAVY BRONCHIAL ASTHMA

Elena Andreevna GERENG, Irina Vladimirovna SUKHODOLO, Raisa Ivanovna PLESHKO, Lyudmila Mikhailovna OGORODOVA, Lyudmila Ivanovna VOLKOVA, Polina Aleksandrovna SELIVANOVA, Anna Nikolaevna DZYUMAN

Siberian State Medical University
2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050

Research objective was the establishment of morphological signs of endothelial dysfunctions of vessels of a mucous membrane of bronchial tubes at patients with various clinical variants of severe uncontrolled bronchial asthma. By means of histologic, electron-microscopic and morphometrical research methods it is established, that the «brittle» phenotype of severe bronchial asthma is notable for the strengthening of endothelial cell secretory processes and activation of a transcapillary exchange, and haemodynamic disorders at a chronic asthma with the fixed obstruction are accompanied with perivascular fibrosis development and capillary bed reduction.

Key words: ultrastructure of bronchi, endothelial dysfunction, capillaries.

Gereng E.A. — candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for morphology; e-mail: e-gereng@mail.ru

Suhodolo I.V. — doctor of medical sciences, professor; head of the chair for morphology, e-mail: suhodolo@sibmail.com

Pleshko R.I. — doctor of medical sciences, professor of the chair for morphology, e-mail: raisap57@mail.ru

Ogorodova L.M. — doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, honored worker of science, head of the chair for departmental pediatrics with the course of child disease of medical faculty, e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Volkova L.I. — doctor of medical sciences, professor, head of the chair for internal diseases of pediatric faculty, e-mail: volkova@mail.ru

Selivanova P.A. — assistant of the chair for hospital therapy with the course of physical rehabilitation and sports medicine, e-mail: pselivanova@mail.ru

Dzyuman A.N. — candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for morphology, e-mail: dzyman@vtomske.ru