

ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ ЗА УМОВИ ГОСТРОГО УРАЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ У ДИНАМІЦІ

ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ ЗА УМОВИ ГОСТРОГО УРАЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ У ДИНАМІЦІ – Експериментальні дослідження виконано на 36 беспородних статевозрілих щурах-самцях, яких поділили на 3 групи. Наведено результати ультраструктурних змін легень при експериментальному гострому ураженні легень через 12 та 24 год. Встановлено, що морфологічні зміни у респіраторному відділі легень при гострому ураженні легень реалізуються в комплексі дистрофічних і деструктивних реакцій у структурах аерогематичного бар'єра, при цьому основними морфогенетичними типами селективної загибелі клітин легень є апоптоз та некроз.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕГКИХ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ПОРАЖЕНИИ ЛЕГКИХ В ДИНАМИКЕ – Экспериментальные исследования выполнены на 36 беспородных половозрелых крысах-самцах, которых разделили на 3 группы. Приведены результаты ультраструктурных изменений легких при экспериментальном остром поражении легких через 12 и 24 ч. Установлено, что морфологические изменения в респираторном отделе легких при остром поражении легких реализуются в комплексе дистрофических и деструктивных реакций в структурах аерогематического барьера, при этом основными морфогенетическими типами селективной гибели клеток легких являются апоптоз и некроз.

ELECTRONIC AND MICROSCOPIC STUDY OF RATS' LUNGS AT ACUTE LUNG INJURY IN DYNAMICS – Experimental studies were performed on 36 white adult male rats that were divided into 3 groups. Results of ultrastructural changes of the lungs at experimental acute lung injury after 12 and 24 hours were presented. There were revealed morphological changes in the respiratory part of the lungs at acute lung injury which are implemented in a complex of degenerative and destructive reactions in the aerohematic barrier structures. It was found out that the major morphogenetic types of selective cell death at acute lung injury are pulmonary apoptosis and necrosis.

Ключові слова: гостре ураження легень, гідрохлоридна кислота, електронна мікроскопія.

Ключевые слова: острое поражение легких, гидрохлоридная кислота, электронная микроскопия.

Key words: acute lung injury, hydrochloric acid, electronic microscopy.

ВСТУП Гостре ураження легень (ГУЛ), на думку багатьох авторів, зустрічається при багатьох критичних станах, зокрема пневмонія, дифузна альвеолярна кровотеча, аспірація шлункового вмісту або меконія, пряме пошкодження, забій, пересадка легень, міліарний туберкульоз, неврогенний набряк легень у результаті інсульту, судом, травми голови, сепсис, шок, опікова хвороба, гострі респіраторні вірусні інфекції та інші, й визначає тяжкість перебігу і результат основного захворювання [1–7].

Актуальність проблеми визначають частотою розвитку ГУЛ у хворих при критичних станах, загрозою життя хворого, низькою ефективністю медикаментозної терапії, матеріальними затратами при лікуванні. Згідно з статистичними даними 2002 року частота розвитку ГУЛ в Європі складає приблизно 17–45, а в США – 17–64 випадків на 100 тис. населення. Смертність в країнах Європи у випадку ГУЛ становить 22,6 %, при ГРДС – 34–58 % [8, 9].

Патолофізіологічною основою ГУЛ є ураження мікросудин малого кола кровообігу, що зумовлює підвищення проникності альвеоло-капілярного бар'єра та виходу плазми крові до альвеолярного простору з наступним інтерстиціальним набряком [10]. Цей процес підтримується за участі медіаторів запалення або механічного стресу [11].

Незалежно від етіології патологічного процесу, як показують результати наших та інших досліджень, ключову роль у розвитку запалення при ГУЛ відіграють нейтрофіли, які акумулюються власне в легенях [12, 13]. Активація нейтрофілів супроводжується гіперпродукцією цитокінів, які, у свою чергу, активують метаболічні процеси в ендотелії [14]. Внаслідок адгезії лейкоцитів до ендотелію також зростає кількість активних форм кисню, секреторна дегрануляція (протеази, лізосомальні полікатіонні протеїни), які мають пряму пошкоджувальну дію на ендотеліальні клітини, що зумовлює підвищення проникності капілярів [15]. Важливим є дослідження не тільки біохімічних та морфологічних змін, що лежать в основі ГУЛ, але й ознаки ураження на клітинному рівні. Проте у вітчизняній та зарубіжній літературі недостатньо висвітлено питання електронно-мікроскопічних змін легень при ГУЛ внаслідок аспірації в динаміці, що є важливим як для створення діагностичних алгоритмів, так і для вибору тактики лікування та зумовлює актуальність цього дослідження.

Метою дослідження стало з'ясувати мікроскопічні зміни в легенях при експериментальному ГУЛ через 12 та 24 год.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Досліди були проведені на 36 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях масою 200–220 г, яких утримували на стандартному раціоні виварію Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського. Тварин поділили на 3 експериментальні групи: перша – контрольна група (n=12), друга – моделювання ГУЛ, спостереження через 12 год (n=12), третя – моделювання ГУЛ, спостереження через 24 год (n=12). Усі втручання проводили з дотриманням принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1985 р.) та ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001 р.). Для дослідження вибрали нейтрофілзалежну експериментальну модель ГУЛ з інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти, рН 1,2 в дозі 1,0 мл/кг на вдиху [16]. Після закінчення експерименту всіх тварин піддавали евтаназії. Забір та вирізку матеріалу для електронно-мікроскопічного дослідження здійснювали у тварин через 12 та 24 год після ураження.

Для електронно-мікроскопічних досліджень забирали маленькі шматочки респіраторного відділу легень з крайових часток. Матеріал фіксували у 2,5 % розчині глутаральдегіду, постфіксували 1 % розчином тетраоксиду осмію на фосфатному буфері, зневоднювали в спиртах і ацетоні та заливали в суміш аралдиту з епок-

сидними смолами [17]. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікромтомі ЛКВ-3, контрастували ураніацетатом та цитратом свинцю за методом Рейнольдса і вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ При електронно-мікроскопічному дослідженні легеневої тканини експериментальних тварин з ГУЛ на 12 та 24 год досліджу було відмічено значні зміни ультраструктури альвеолоцитів. Ці зміни охоплюють майже всі елементи аерогематичного бар'єру. Так, субмікроскопічні дослідження легень при експериментальному ГУЛ, проведені через 12 год досліджу, показали, що в респіраторному відділі частина альвеол має значно розширені просвіти кровонесних капілярів. У них багато тромбоцитів, є лімфоцити, нейтрофіли і зміненої форми еритроцити. Стінка таких альвеол має витоншені та потовщені ділянки (рис. 1).

Наявні також менших розмірів альвеоли з помірними просвітами гемокапілярів та значно зміненою стінкою. В складі аерогематичного бар'єра присутня нерівномірної товщини базальна мембрана, вона потовщена з боку інтерстицію і витоншена з вільного боку. Плазмолема ендотеліоцитів і респіраторних епітеліоцитів хвиляста. Цитоплазматичні частини ендотеліальних клітин також мають різну товщину, утворюють випинання в просвіт кров'яного капіляра. Ядра ендотеліоцитів невеликі, осміофільні, майже вся каріоплазма виконана гетерохроматином. Зона органел таких клітин малої площі й органи в ній поодинокі та пошкоджені.

Цитоплазматичні ділянки респіраторних епітеліоцитів нерівномірні, суттєво потовщені, електронно-прозорі, їх зовнішня мембрана утворює випинання та інвагінації, піноцитозних пухирців і кавеол мало (рис. 2).

Такий стан аерогематичного бар'єра, потовщення його стінки свідчить про суттєве погіршення газообміну в респіраторному відділі легень.

Альвеолоцити II типу, в цей термін спостереження, при моделюванні ГУЛ гідрохлоридною кислотою також значно змінені. Їх ядра зберігають округло-овальну форму, проте значно змінюється каріолема. Вогнищево значно розширюється перинуклеарний простір за рахунок відшарування зовнішньої ядерної мембрани.

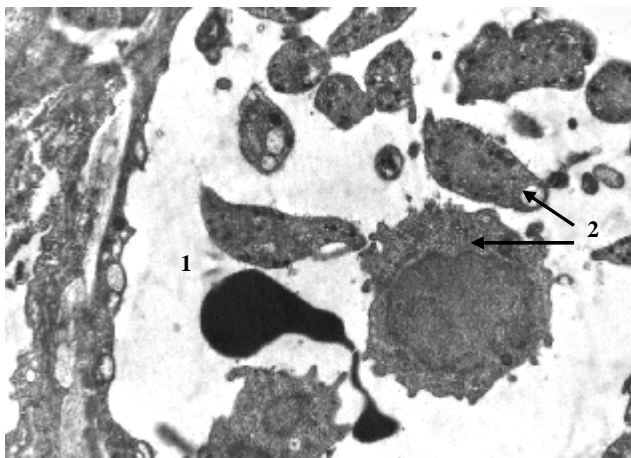


Рис. 1. Ультраструктурний стан стінки альвеоли через 12 год при експериментальному гострому ураженні легень. Просвіт гемокапіляра (1), численні форменні елементи крові (2). x 5 000.

Наявні ділянки локального пошкодження і внутрішньої ядерної мембрани. Ядерних пор у каріолемі небагато. Вони втрачають структурованість. У каріоплазмі багато осміофільного гетерохроматину, ядерця збережені.

У цитоплазмі таких альвеолоцитів деструктивно змінені органели. Мітохондрії мають осміофільний гомогенізований матрикс, у якому кристи не виявляються, або наявні їх фрагменти. Нечітка і зовнішня мітохондріальна мембрана. Потовщені, фрагментовані каналці гранулярної ендоплазматичної сітки та цистерни комплексу Гольджі, вони нагадують вакуолі. Значно змінені пластинчасті тілця, вони у вигляді електронно-прозорих порожнин, іноді великі й неправильної форми та мають небагато периферійно розташованого осміофільного матеріалу. Апікальна ділянка плазмолема утворює випинання, мікрворсинки поодинокі та фрагментовані (рис. 3).

Альвеолярні макрофаги мають у цитоплазмі багато різної електронної щільності фагосом. Первинних лізосом небагато, вони невеликі, округлі, осміофільні. Плаз-

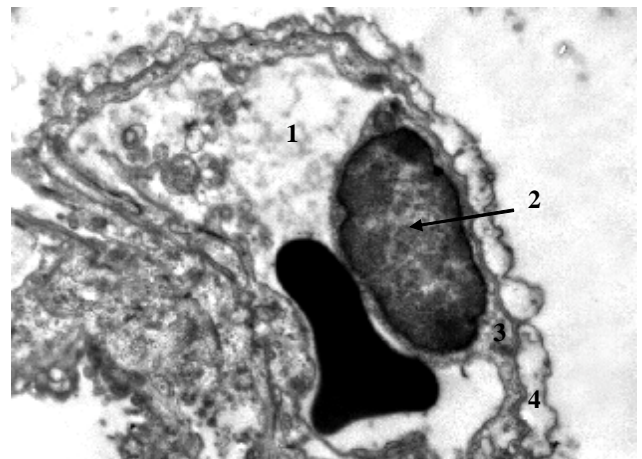


Рис. 2. Ультраструктурний стан стінки альвеоли через 12 год при експериментальному гострому ураженні легень. Просвіт гемокапіляра (1), ядро (2) і цитоплазма ендотеліоцита (3), набрякла цитоплазматична ділянка респіраторного альвеолоциту (4). x 7 000.

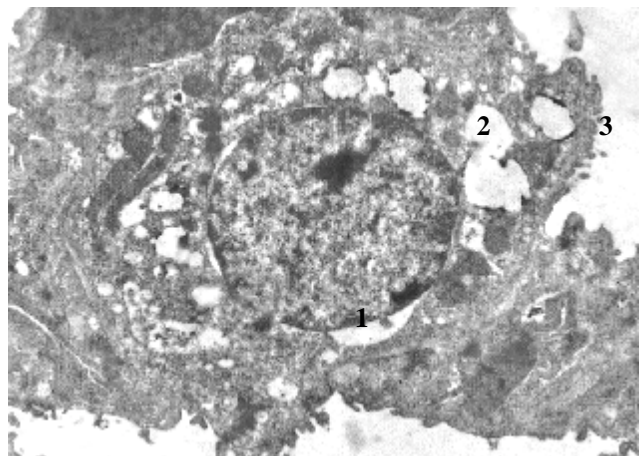


Рис. 3. Субмікроскопічні зміни альвеолоциту II типу через 12 год після експериментального гострому ураженні легень. Ядро зі збільшеними перинуклеарними просторами (1), світлі вакуолеподібні структури (2), апікальна ділянка плазмолема з окремими мікрворсинками (3). x 8 000.

молема макрофагів нерівна, але цитоплазмичних виростів мало. Крім такого типу макрофагів спостерігають клітини, що мають округлі ядра, добре структуровану цитоплазму. Для них характерні поодинокі великі цитоплазматичні вирости, які розміщені на поверхні альвеол, а окремі вільно розташовуються у просвіті клітин. Такі ультраструктурні ознаки макрофагів свідчать про здатність клітини фагоцитувати крупні пошкоджені структури (можливо це малодиференційовані клітини, що мігрують з інтерстицію у просвіт альвеоли).

Субмікроскопічно через 24 год при експериментальному ГУЛ, індукованому інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти, в респіраторному відділі частина альвеол має значно розширені кровоносні капіляри, в просвітах яких спостерігають нейтрофіли, тромбоцити, еритроцити. Їх стінка має витоншені та потовщені ділянки.

Також є альвеоли з помірними просвітами гемокапілярів. Компоненти стінки таких альвеол нечіткі, виявляються місця пошкодження цитоплазматичних ділянок ендотеліоцитів. Відмічають пошкодження базальної мембрани, на окремих ділянках вона не контурується. Цитоплазматичні ділянки респіраторних епітеліоцитів мають місця потовщення, піноцитозних пухирців мало (рис. 4).

Виявляють окремі альвеоли, у яких просвіти гемокапілярів маленькі, без формених елементів крові. Компоненти аерогематичного бар'єра значно змінені. Цитоплазматичні ділянки ендотеліоцитів мають вузькі, осміофільні ділянки й окремі, в яких наявні піноцитозні пухирці. Базальна мембрана нечітка, на окремих ділянках вона розшаровується. Цитоплазма респіраторних альвеолоцитів набрякла, нерівномірно потовщена, на окремих ділянках значно потовщена з утворенням великих випинань (рис. 5).

Біля стінки таких альвеол наявні безструктурні маси, що є, мабуть, старими неутілізованими формами сурфактанта.

Для ультраструктури альвеолоцитів II типу характерні значно зміненої форми ядра. Їх каріолема нерівна, утворює інвагінації. Наявні значні перинуклеарні простори, ядерні пори поодинокі. Гетерохроматин осміофільними ділянками розташований вздовж

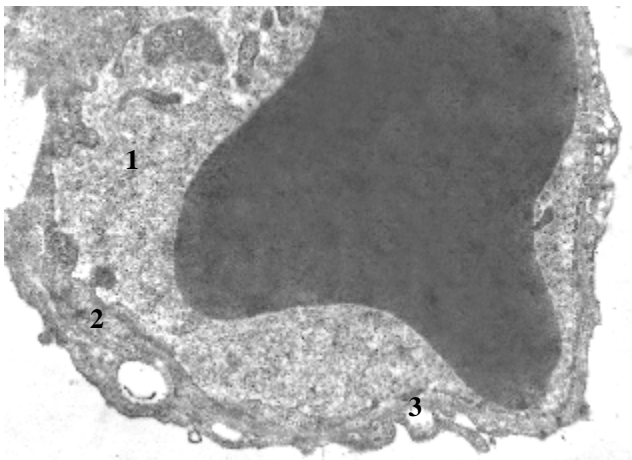


Рис. 4. Ультраструктура альвеоли через 24 год при експериментальному гострому ураженні легень. Просвіт гемокапіляра (1), потовщена ділянка альвеолоциту (2), нечітка базальна мембрана (3). x 9 000.

каріолеми та утворює грудки у каріоплазмі, ядерця відсутні. В цитоплазмі пластинчастих тілець мало, вони гіпертрофовані, мають значні електронно-прозорі ділянки, осміофільний шаровий матеріал наявний в окремих тільцях. Органели, що відповідають за секрецію, не виявляються, є їх фрагменти. Мітохондрії зустрічають рідко, вони деструктивно змінені. В цитоплазмі є неправильної форми світлі структури. На апікальній частині альвеолоцитів II типу плазмалема потовщена, нечітка, має поодинокі мікрворсинки, наявні оголені місця.

Альвеолярні макрофаги мають у цитоплазмі багато різної електронної щільності фагосом. Вони можуть бути різними за розмірами і формою, як округлі, так і неправильної форми. Первинних лізосом небагато, вони невеликі, округлі, осміофільні. Мітохондрії мають гомогенізований матрикс, у якому кристи не виявляються. Округлої форми невеликі ядра зі значними осміофільними ділянками гетерохроматину. Плазмалема макрофагів нерівна, але виростів цитоплазми мало (рис. 6).

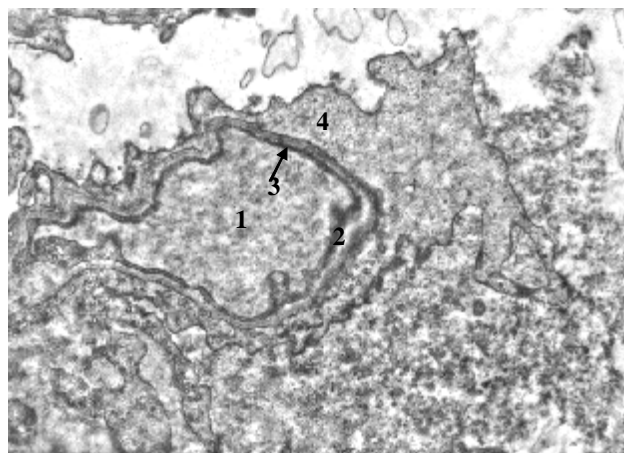


Рис 5. Ультраструктурні зміни альвеоли через 24 год при експериментальному гострому ураженні легень. Вузький просвіт гемокапіляра (1), потовщена ділянка базальної мембрани (2), осміофільна цитоплазма ендотеліоциту (3), набряк цитоплазми респіраторного альвеолоциту. x 6000.

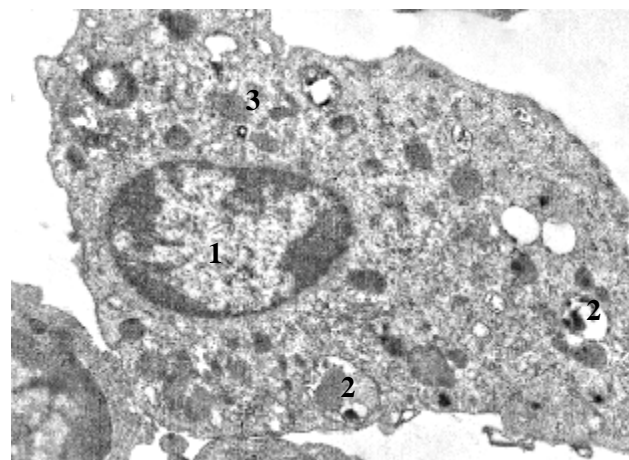


Рис. 6. Ультраструктура альвеолярного макрофага через 24 год експериментального гострого ураження легень. Невелике ядро (1), крупні, різної електронної щільності фагосоми (2), пошкоджені мітохондрії (3). x 7 000.

Такий стан макрофага свідчить про пригнічення їх функціональної активності та виснаження.

Відомо, що легені є складною метаболічною системою, яка здатна забезпечувати газообмінну функцію, збереження гомеостазу, захищати організм від чинників зовнішньої агресії, при цьому різні клітинні системи легень мають власну, строго визначену функцію [18]. Резистентність легеневої тканини до пошкоджувальних агентів визначають механізмами неспецифічного захисту, до яких відносять мукоциліарну та сурфактантну системи, ступінь аерації, стан кровообігу, фагоцитарну активність нейтрофілів і макрофагів [19].

Виявлені мікроскопічні зміни є ознаками ГУЛ, яке у відповідь на дію пошкоджувального чинника, зокрема гідрохлоридної кислоти, проявлялось наростанням системної запальної реакції в міру та суттєвим погіршенням газообміну в респіраторному відділі легень. Активація прозапальних цитокінів зумовлює міграцію нейтрофільних гранулоцитів у легені, підвищення проникності судин та розвиток набряку легень, що підтверджується нашими та іншими дослідженнями [20, 21]. В результаті відбувається згущення крові й порушення мікроциркуляції, що мікроскопічно проявляється великою кількістю тромбоцитів, лімфоцитів, нейтрофілів та змінених форм еритроцитів у просвітах кровоносних капілярів. Пошкодження ендотеліоцитів може виникати при активації симпатoadреналової системи внаслідок безпосередньої дії пошкоджувального чинника. Надмірний викид катехоламінів у стрес-реакції зумовлює гіперпродукцію біологічно активних речовин, насамперед прозапальних цитокінів, вільних кисневих радикалів, які сприяють прогресуванню структурних і функціональних змін у легенях [14, 15].

Встановлене пошкодження альвеолоцитів II типу в щурів із модельованим ГУЛ, основна функція яких – попередження спадання альвеол на видосі за рахунок синтезу фосфоліпідів і білків сурфактанта, зумовлює прогресування гіпоксії за рахунок збільшення проникності альвеоло-капілярної мембрани та наростання набряку легень.

Через 12 год спостереження в усіх апоптотично і пренекротично ущільнених альвеолоцитах II типу визначили каріопікноз із глибчастою конденсацією і маргінацією хроматину, набрякання мітохондрій зі значною редуцією крист, розширення вакуолей комплексу Гольджі й цистерн гранулярної ЕПС без прикріплених рибосом. Цитоплазма таких альвеолоцитів II типу відрізнялась підвищеною осміофілією нуклеопротейдів і дезінтегрованих рибосом. Ущільнені й зменшені альвеолоцити були оточені розширеними відростками макрофагів, які зберігали здатність до фагоцитозу. Такі структурні зміни могли бути однією з фаз апоптозу альвеолоциту II типу напередодні його дезінтеграції каспазами, а могли бути також проявами розвитку некрозу легеневої тканини.

На відміну від патогенно-індукованого апоптозу, що виникав через 12 год моделювання ГУЛ, характерною ознакою якого була збереженість ядра в пікнотизованому ядрі, електронно-мікроскопічний аналіз легеневої тканини через 24 год експерименту вказував на явища некрозу, оскільки виявлено глибокий пікноз ядра з відсутністю в ньому ядра.

ВИСНОВКИ Результати проведених досліджень дозволяють вважати, що механізм пошкодження легень при ГУЛ, індукованому інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти, зумовлений гетерогенними порушеннями перфузії та альвеолярної вентиляції, які наростають в міру прогресування захворювання. Морфологічні зміни у респіраторному відділі легень при ГУЛ реалізуються в комплексі дистрофічних і деструктивних реакцій у структурах аерогематичного бар'єра, при цьому основними морфогенетичними типами селективної загибелі клітин легень є апоптоз та некроз.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Soluble endothelial selectin in acute lung injury complicated by severe pneumonia / D. Osaka, Y. Shibata, K. Kanouchi [et al.] // *Int. J. Med. Sci.* – 2011. – Vol. 8, № 4. – P. 302–308.
2. Diagnosis of acute respiratory distress syndrome in nosocomial pneumonia / A. N. Kuzovlev, V. V. Moroz, A. M. Goloubev, S. G. Polovnikov // *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 231–241.
3. Weibrecht K. W. Acute respiratory distress associated with inhaled hydrocarbon / K. W. Weibrecht, S. H. Rhyee // *Am. J. Ind. Med.* – 2011. – Vol. 54, № 12. – P. 911–914.
4. Ikpeama L. C. Diffuse alveolar hemorrhage-induced respiratory failure / L. C. Ikpeama, B. K. Bailes // *Crit. Care Nurs. Q.* – 2012. – Vol. 35, № 2. – P. 124–133.
5. Волосовець О. П. Сучасні погляди на проблему синдрому аспірації меконію у новонароджених / О. П. Волосовець, С. П. Кривопустов, Н. С. Пищюра // *Acta Medica Leopoliensia.* – 2010. – Vol. 16. – № 1. – С. 89–93.
6. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury / A. Dushianthan, M. P. Grocott, A. D. Postle, R. Cusack // *Postgrad. Med. J.* – 2011. – Vol. 87, № 1031. – P. 612–622.
7. Khadawardi H. A. Acute respiratory distress syndrome with miliary tuberculosis / H. A. Khadawardi, A. G. Gari // *Saudi Med. J.* – 2012. – Vol. 33, № 1. – P. 83–86.
8. Incidence and outcomes of acute lung injury / Rubenfeld G. D., Caldwell E., Peabody E. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353. – P. 1685–1693.
9. Wheeler A. P. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review / A. P. Wheeler, G. R. Bernard // *Lancet.* – 2007. – Vol. 369. – P. 1553–1564.
10. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different / P. Pelosi, D. D'Onofrio, D. Chiumello [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2003. – Vol. 22. – P. 48–56.
11. Fishel R. S. Vessel injury and capillary leak / R. S. Fishel, A. Barbul // *Crit. Care Med.* – 2003. – Vol. 31. – P. 502–511.
12. Заяць Л. М. Роль нейтрофілів у розвитку гострого пошкодження легень при експериментальному перитоніті / Л. М. Заяць // *Галицький лікарський вісник.* – 2004. – Т. 11, № 1. – С. 51–54.
13. Патогенетична роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку гострого ураження легень / А. А. Гудима, М. І. Марущак Г. Г. Габор, М. І. Куліцька // *Буковинський медичний вісник* – 2011. – № 3. – С. 82–86.
14. Modulation of chemokine production in lung microvascular endothelial cells by dopamine is mediated via an oxidative mechanism / G. C. Beck, R. Oberacker, S. Kapper [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 25, № 5. – P. 636–643.
15. A Chemical Perspective on the Interplay Between NO, Reactive Oxygen Species, and Reactive Nitrogen Oxide Species / M. G. Esprey, K. M. Miranda, D. D. Thomas [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 962. – P. 195–206.
16. Matute-Bello G. Animal models of acute lung injury / G. Matute-Bello, C. Frevert, T. Martin // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2008. – V. 295. – P. 379–399.
17. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Петрова. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.
18. Обтурация, аспирация и ингаляция при механической

асфиксии / В. А. Путинцев, Д. В. Богомолов, Д. В. Сундуков, П. Шаман // Судебно-медицинская экспертиза. – 2011. – № 1. – С. 23–24.

19. Лысикова М. Механизмы воспалительной реакции и воздействие на них с помощью протеолитических энзимов / М. Лысикова, М. Вальд, З. Масиновски // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 3. – С. 48–53.

20. Марущак М. І. Зміни газового складу крові при експериментальному гострому ураженні легень у динаміці /

М. І. Марущак // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2011. – № 1. – С. 75–78.

21. Дельцова О. І. Патоморфологічні зміни легень при експериментальному синдромі гострого легеневого пошкодження на тлі емульсійної вентиляції легень перфтораном / О. І. Дельцова, С. Б. Герашенко, І. І. Тітов // Український медичний альманах. – 2000. – Т. 3, № 3. – С. 54–56.

22. Acute remodeling of parenchyma in pulmonary and extrapulmonary ARDS. An autopsy study of collagen elastic system fibers / E. M. Negri, C. Hoelz, C. S. V. Barbas [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 2002. – Vol.198. – P. 355–361.

Отримано 23.04.12