

УДК [612.46:612.2]:611.018.61

К ВОПРОСУ О КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМАХ РЕАКТИВНОСТИ ГЛАДКОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ НЕКОТОРЫХ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ ОРГАНОВ

© 2014 г. Е. Н. Башилова, А. Л. Зашихин, Ю. В. Агафонов

Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск

В работе проведен сравнительный структурно-метаболический анализ изолированных гладких миоцитов различных отделов мочевыносящих и воздухоносных путей человека в условиях нормального функционирования и при изменении функциональной нагрузки по обструктивному типу. Выявлены общие принципы структурной организации гладкой мышечной ткани данных органов систем, а также подтверждена взаимосвязь величины функциональной нагрузки и степени морфофункциональных изменений метаболических параметров гладкой мускулатуры при обструктивном типе нарушения проходимости органа.

Ключевые слова: гладкая мышечная ткань, реактивность

В предыдущих работах [2, 9, 11] нами дана структурно-функциональная характеристика гладкой мышечной ткани (ГМТ) различных висцеральных органов (желудочно-кишечный тракт, мочевыделительная система, воздухоносные пути). Были выявлены общий принцип тканевой детерминации интактной ГМТ, а также фенотипическая модуляция лейомиоцитов, связанная с особенностями функциональной деятельности органов.

Целью настоящего исследования стало проведение сравнительного структурно-метаболического анализа ГМТ различных отделов мочевыносящих и воздухоносных путей в условиях нормального функционирования и выявление базисных клеточных и тканевых механизмов реактивной трансформации мускулатуры данных органов, связанных с изменением функциональной нагрузки по обструктивному типу. Изучение механизмов тканевой реактивности ГМТ данных органов систем в условиях сравнимых изменений функциональной нагрузки на примере выбранной модели человека (так как иные модели практически невозможны) представляется актуальной в связи с тем, что расшифровка тканевых цитологических механизмов работы гладкой мускулатуры создает базу для разработки новых эффективных методов лечения таких распространенных форм заболеваний, как обструктивные поражения мочеточника, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), и связанных с ними тяжелых осложнений (хроническая почечная недостаточность, гидронефроз, хроническая легочная недостаточность).

Методы

Изучение морфофункциональной организации гладкой мускулатуры мочевыносящих и воздухоносных путей человека проводили на операционном материале резецированных интактных отделов (почечная лоханка, проксимальный и дистальный отделы мочеточников, резецированных отделов легких, включающих бронхи крупного, среднего и малого калибра) людей в возрасте 40–60 лет, прооперированных по поводу опухолей почек с частичной резекцией мочевого пузыря (12 пациентов) и периферических опухолей легких (20 пациентов). Изучение этого материала в качестве группы сравнения является общепринятой в мировой практике [9]. В анамнезе у пациентов отсутствовали вентиляционные нарушения и хронические воспалительные заболевания мочевыделительной системы, что позволило рассматривать их в качестве группы сравнения при изучении реактивных трансформаций ГМТ.

Исследование реактивной структурно-метаболической перестройки ГМТ бронхов и различных отделов мочевыделительной системы проведено на материале идентичных отделов данных органов при развитии нарушения проходимости по обструктивному типу. Анализ нарушения вентиляции обструктивного типа проведен на материале легких пациен-

тов с ХОБЛ средней степени тяжести (16 пациентов). Наличие обструкции было подтверждено данными спирографии (жизненная емкость легких — ЖЕЛ составила 85–95 %, объем форсированного выдоха — ОФВ1 50–74 %. Уровень преимущественной обструкции у всех пациентов оценивался по показателям средней объемной скорости выдоха на уровне 50–75 % форсированной ЖЕЛ). Материал дистального отдела мочеточника получен у 8 пациентов, прооперированных по поводу опухолевого процесса мочевого пузыря, обтурирующего устье мочеточника, сопровождающегося стойкими нарушениями проходимости органа. Диагноз у обеих групп пациентов был подтвержден данными функциональной и лабораторной диагностики.

Фиксация материала осуществлялась в 10 % формалине на фосфатном буфере (РН = 7.2–7.4) в течение 14–20 суток. Для получения изолированных гладких мышечных клеток (ГМК) использовали метод прицельной клеточной диссоциации [5]. Исследование ДНК в ядрах проводили по методу Фельгена, суммарный белок цитоплазмы выявляли амидочерным. Оптическую плотность ядер и цитоплазмы определяли цитоспектрофотометрическим методом на сканирующем цитофотометре (МФТХ-2М) при длине волны 546 нм для ядер, 580 нм для цитоплазмы. Объемы гладких миоцитов и их ядер вычисляли по формуле эллипсоида. Цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением среднего арифметического (\bar{X}) и его стандартной ошибки (s_x), коэффициента вариации, асимметрии и эксцесса. Степень вероятности отличий (p) измеряемых величин определяли с помощью t -критерия Стьюдента при $p < 0,05$. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программной си-

стемы Statistica 6.0. Для выявления существования взаимосвязей между некоторыми параметрами гладких миоцитов использовали регрессионный анализ. Для электронно-микроскопического анализа препараты обрабатывали по общепринятой методике и просматривали в электронном микроскопе JEM-100 CX.

Результаты

Характер гистограмм распределения продемонстрировал вариабельность объема ГМК в составе мышечной ткани всех исследованных отделов легких и мочевиносящих путей. Гладкая мышечная ткань включала три группы миоцитов — малые, средние, большие (рис. 1). Дифференцированный анализ выявил различия не только в объемных, но и метаболических характеристиках различных типов ГМК. Малые миоциты характеризуются наибольшим ядерно-цитоплазменным отношением и высоким содержанием суммарного белка в цитоплазме. В этой группе наибольшая доля гиперплоидных миоцитов (24,8 % в мочеточнике, 34,9 % в бронхах). Средние миоциты представляют зрелую и функционально активную субпопуляцию. Удельный вес гиперплоидных клеток в этой группе составил 9,8 % в мочеточнике, 19,2 % в бронхах. Большие миоциты характеризуются наименьшим ядерно-цитоплазменным отношением, представительство ДНК-синтезирующих миоцитов в этой группе также наименьшее на всех уровнях мочевиносящих путей (9,4 % в мочеточнике и отсутствие в бронхах). Уровень цитоплазматического белка ниже, чем в других миоцитах.

Нами выявлено сходное изменение структуры популяции ГМК на разных уровнях бронхов (от мелких к крупным) и мочевиносящих путей (от почечной лоханки к дистальному отделу), которое проявляется снижением долевого содержания малых миоцитов

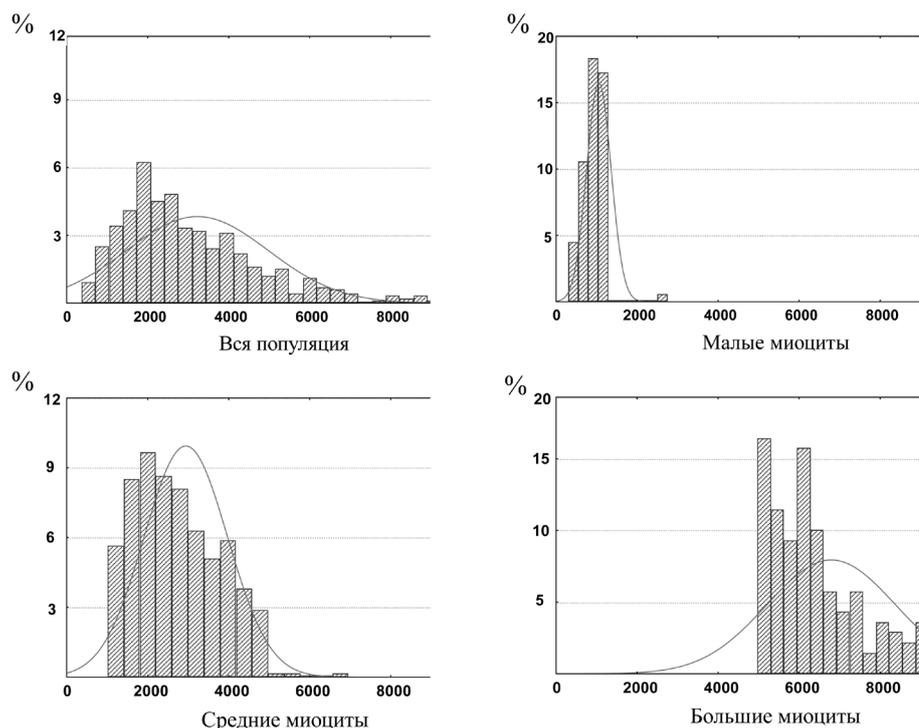


Рис. 1. Распределение гладких миоцитов мочеточника взрослого по объему клеток с кривой нормального распределения. По оси абсцисс — объем клеток в $\mu\text{м}^3$, по оси ординат — количество клеток в процентах



Рис. 2. Структура популяции гладких мышечных клеток различных отделов мочевыносящих и воздухоносных путей человека

и нарастанием представительства больших ГМК (рис. 2).

К дистальному отделу мочеточника и по мере увеличения калибра бронхов параллельно с увеличением долевого содержания больших миоцитов отмечается снижение представительства гиперплоидных клеток (с 20,7 % в почечной лоханке до 6,4 % в дистальном отделе мочеточника, с 40 % в мелких бронхах до 10 % в бронхах крупного калибра). В мочеточнике отмечается нарастание синтетических процессов в цитоплазме миоцитов, о чем свидетельствует рост

представительства клеток с высоким показателем оптической плотности белка в цитоплазме с 14,3 % в области почечной лоханки до 33,7 % в проксимальном и 84,3 % в дистальном отделе мочеточника. В бронхах долевого содержания клеток с высоким уровнем цитоплазматического белка снижается с 35 до 18 % (малого и крупного калибра соответственно).

Электронно-микроскопическое исследование ГМТ отделов мочевого тракта и воздухоносных путей подтверждает полученные данные и свидетельствует о том, что в ее состав входят клетки, характеризующие

Морфометрические и цитофотометрические показатели лейомиоцитов бронхов и дистального отдела мочеточника человека в норме и при заболеваниях, среднее арифметическое $X \pm x$

Показатель	Бронхи норма	Обструктивные нарушения вентиляции легких	Дистальный отдел мочеточника норма	Обструкция мочеточника
Объем миоцитов, мкм ³	1914,41 ± 48,4	2246,7 ± 56,18**	3952,25 ± 141,96	5701,7 ± 201,18***
в т. ч.: малых	717,0 ± 11,3	700,8 ± 16,6	1131,14 ± 86,3	1148,17 ± 50,37
средних	2122,7 ± 29,8	2201,9 ± 31,47**	3268,99 ± 88,32	3127,4 ± 61,06
больших	5728,7 ± 225,1	5800,1 ± 143,37**	6830,4 ± 218,14	9201,14 ± 327,6***
Структура популяции, %:				
малые, средние, большие ГМК	39,0 51,6 9,4	29,3 57,4 13,3	10,5 76,7 12,8	4,1 52,2 43,7
Ядерно-цитоплазматическое отношение миоцитов	0,064 ± 0,002	0,082 ± 0,011	0,038 ± 0,0014	0,037 ± 0,002
в т. ч.: малых	0,11 ± 0,004	0,283 ± 0,037	0,066 ± 0,0096	0,11 ± 0,028**
средних	0,040 ± 0,002	0,049 ± 0,0008	0,041 ± 0,0016	0,044 ± 0,003
больших	0,02 ± 0,002	0,016 ± 0,0006	0,024 ± 0,0018	0,02 ± 0,0008
Оптическая плотность ядер миоцитов, отн. ед.	0,68 ± 0,007	0,70 ± 0,0058*	0,896 ± 0,009	0,724 ± 0,006**
в т. ч.: малых	0,781 ± 0,027	0,715 ± 0,009*	0,91 ± 0,024	0,78 ± 0,029
средних	0,746 ± 0,011	0,69 ± 0,007*	0,897 ± 0,009	0,726 ± 0,008
больших	0,678 ± 0,013	0,68 ± 0,04*	0,872 ± 0,032	0,718 ± 0,009
Миоциты с гиперплоидными ядрами, %	23,0	12,8	6,4	2,5
в т. ч.: малых	34,9	17,4	8,9	4,8
средних	19,2	11,0	3,8	2,6
больших	—	10,5	5,9	0,4
Оптическая плотность суммарного белка цитоплазмы, отн. ед.	0,409 ± 0,002	0,45 ± 0,003**	0,569 ± 0,0065	0,512 ± 0,003**
Содержание миоцитов с высокой оптической плотностью цит., %	24,5	68,7	48,2	31,3

Примечание. Статистически значимые различия с интактным материалом: * – $p < 0,05$ и выше; ** – $p < 0,01$ и выше; *** – $p < 0,001$ и выше.

щиеся различиями в ультраструктурной организации. Она содержит типичные сократительные ГМК, мало дифференцированные миоциты, интерстициальные клетки, а также ГМК, характеризующиеся различной электронной плотностью цитоплазмы [10].

Изучение ГМТ при обструктивном типе нарушения проходимости, сопровождающемся снижением функциональной нагрузки, выявило статистически значимое нарастание средних объемных показателей лейомиоцитов в обеих органах системы (таблица). При этом изменения структуры популяции характеризуются снижением доли малых и средних при существенном возрастании представительства больших лейомиоцитов.

Обструктивный тип нарушения проходимости мочеочечника и бронхов вызывает значительное снижение количества гиперплоидных клеток. Наиболее сильно это отразилось на группе малых ГМК как в бронхах, так и в мочеточнике.

Исследование содержания цитоплазматических белков обнаружило различную модуляцию этого показателя в бронхах и мочеточнике. При обструкции мочеточника выявлено статистически значимое уменьшение миоцитов с высоким уровнем цитоплазматических белков во всех группах клеток, что отражает различный характер перестройки внутриклеточных обменных процессов в разных субпопуляциях миоцитов в ответ на изменение функциональной нагрузки. Ультраструктурный анализ свидетельствует о том, что наряду с отеком межклеточного вещества, сопровождающимся увеличением пространства между миоцитами и нарушением межклеточных коммуникаций, были выявлены кластеры миоцитов, имеющих изменения некротического типа. В цитоплазме гибнущих миоцитов наблюдались очаги деструкции миофиламентов и появление миелиновых телец, образование многочисленных вакуолей и расширение перинуклеарного пространства (рис. 3). Наши данные подтверждают мнение ряда авторов [7, 12] о том, что при развитии обструктивного синдрома возможны повреждения

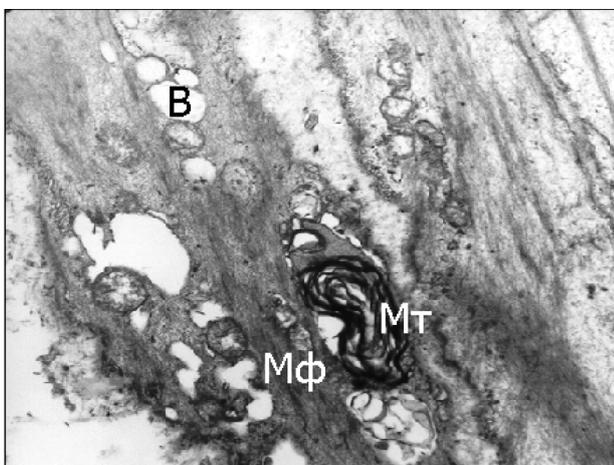


Рис. 3. Участки деструкции миофиламентов, вакуоли в цитоплазме гладкого миоцита мочеточника при обструкции. В – вакуоли; Мт – миелиновые тельца; Мф – миофиламенты. Ув.: 17 000

гладких миоцитов по типу некротических изменений. Наряду с этим мы можем констатировать наличие клеток с ультраструктурными характеристиками, которые характерны для апоптотических процессов (рис. 4).

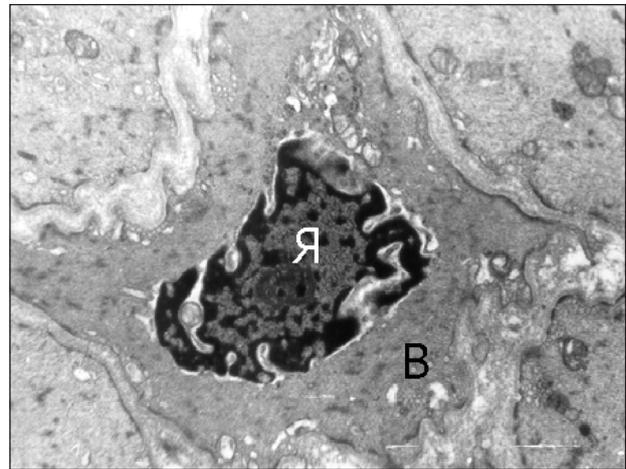


Рис. 4. Апоптотически измененная гладкая мышечная клетка мочеточника при обструкции. Я – ядро миоцита; В – вакуоли. Ув.: 15 000

При обструктивном типе нарушения вентиляции легких отмечается статистически значимое увеличение показателя оптической плотности цитоплазмы. Снижение пролиферативной активности в сочетании с повышением доли миоцитов с высоким уровнем цитоплазматического белка может быть обусловлено их трансформацией к синтетическому фенотипу. При общеморфологическом исследовании в стенках бронхов нами показано возрастание количества фибриллярных компонентов, деформирующих структуру гладкомышечных пучков. При электронно-микроскопическом анализе выявляются клетки с ультраструктурными параметрами синтетического типа ГМК.

Обсуждение результатов

Полученные новые данные о структурно-метаболической организации уровней мочевыносящих путей и разных генераций бронхов подтверждают общие закономерности, выявленные ранее в висцеральной ГМТ [3], а также определяют особенности организации данных зон, обусловленные физическими и функциональными особенностями [1, 4, 6, 8]. В мочеточнике они связаны с уменьшением собственной спонтанной частоты сокращений гладких миоцитов и совпадают с направлением импульсов миогенного ритма, идущих из областей первичной пейсмейкерной активности, расположенных в области почечной лоханки, которые регулируют ритм сокращений гладкой мускулатуры. Область дистального отдела мочеточника формирует границу между верхним и нижним мочевым трактом с большими колебаниями давлений, обеспечивая свободное продвижение мочи против градиента давления. Вероятно, поэтому увеличение в структуре популяции дифференцированных форм миоцитов обуславливает повышение способности к сокращению дистального отдела и предотвращает

возникновение рефлюкса мочи. В легких ламинарный тип воздушного потока и меньшая его скорость в мелких бронхах создают меньшее тангенциальное напряжение на их стенки, что обуславливает более высокое содержание миоцитов с низким уровнем дифференцировки в составе их ГМТ. Высокое представительство малых и средних миоцитов в структуре мелких бронхов, очевидно, является оптимальным для поддержания постоянного тонического напряжения и регуляции воздушных потоков.

Компенсаторно-приспособительные реакции ГМТ бронхов и мочеточников в условиях изменения режима ее функционирования по обструктивному типу реализуются сходными механизмами. Нами показано, что обструктивный тип нарушения проходимости мочеточника вызывает более выраженную тканевую реакцию. Снижение функциональной нагрузки на орган наряду с увеличением средних объемов ГМК, падением пролиферативной активности миоцитов сопровождается также глубоким угнетением их синтетической активности. «Постарение» популяции ведет к уменьшению адаптационных возможностей мускулатуры мочеточника, что приводит к декомпенсации функциональной деятельности мочевыносящих путей.

В легких же небольшое изменение внутреннего диаметра мелких бронхов ведет к значительному увеличению сопротивления и затруднению вентиляции нижележащих отделов воздухоносных путей. Это формирует перераспределение токов воздуха в крупных бронхах и возникновение дополнительных турбулентных воздушных потоков. Данные изменения повышают тангенциальное напряжение на стенку бронхов и действуют на лейомиоциты как фактор повышенной функциональной нагрузки. Это вызывает наряду с общими с мочеточником изменениями активацию процессов цитоплазматического синтеза в миоцитах, вероятно обусловленную трансформацией миоцитов от контрактильного к синтетическому фенотипу. Несмотря на выраженные вентиляционные нарушения, в данном случае мы можем говорить о сохранении работоспособности органа в новых условиях функционирования. Это обеспечивается регенераторно-гиперпластическими процессами, приводящими к резкой структурной перестройке ткани.

Таким образом, выявленные в результате исследования данные подтверждают наличие взаимосвязи величины функциональной нагрузки и степени функциональных нарушений гладкой мышечной ткани двух органных систем и динамического изменения метаболических параметров и структуры клеточной популяций.

Список литературы

1. Гриппи М. Патофизиология легких. М. : Бинум, 1997. С. 332.
2. Долгих О. В., Агафонов Ю. В., Зашихин А. Л. Адаптивная трансформация миомерия крыс при развитии беременности и после родов // Морфология. 2012. Т. 142, № 5. С. 59–63.
3. Зашихин А. Л., Селин Я. Висцеральная гладкая мышечная ткань. Архангельск : Изд. центр СГМУ, 2001. С. 107–135.
4. Зашихин А. Л., Агафонов Ю. В., Бармина А. О. Механизмы реактивности гладкой мышечной ткани воздухоносных путей при экспериментальном бронхоспазме // Морфология. 2009. Т. 136, № 6. С. 69–74.
5. Патент 2104524. Рос. Федерация. Способ получения препаратов изолированных клеток. № 94018751/14 / Зашихин А. Л., Агафонов Ю. В., Лисишников Л. В. : заявл. 23.05.1994, опубл. 10.02.98. Бюл. № 4. С. 11–13.
6. Barnes P. J., Cosio M. G. Cells and mediators of chronic obstructive pulmonary disease // Eur. Respir. Monograph. 2006. Vol. 38. P. 130–158.
7. Dixon J. S., Jen P. Y., Yeng C. K., Gosling J. A. The vesico-ureteric junction in three cases of primary obstructive megaureter associated with ectopic ureteric insertion // Urol. 1998. Vol. 81, N 4. P. 580–584.
8. Gabella G. Development of visceral smooth muscle. Results // Probl. Cell Differ. 2002. Vol. 38. P. 1–37.
9. Halayko A. J., Stelmack G. L., Yamasaki A. Distribution of phenotypically disparate myocytes subpopulations in airway smooth muscle // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2005. Vol. 83. P. 104–116.
10. Hashitani H. Interaction between interstitial cells and smooth muscles in the lower urinary tract and penis // J. Physiol. published online. 2006. DOI:10.1113. P. 1–27.
11. Lau C. L., Chacko S. Identification of two types of smooth muscle cells from rabbit urinary bladder // Tissue and cell. 1996. Vol. 28, N 3. P. 339–355.
12. Payabvash S., Kajbafzadeh A.-M., Tavangar S. M. Myocyte Apoptosis in Primary Obstructive Megaureters: The Role of Decreased Vascular and Neural Supply // J. Urol. 2007. Vol. 178. P. 259–264.

References

1. Grippi M. *Patofiziologiya legkikh* [Pathophysiology of pulmonary]. Moscow, Binom Publ., 1997, p. 332.
2. Dolgikh O. V., Agafonov Yu. V., Zashikhin A. L. Adaptive transformation of rat myometrium during development and after pregnancy. *Morfologiya (Saint Petersburg, Russia)*. 2012, 142 (5), pp. 59-63. [in Russian]
3. Zashikhin A. L., Selin Ya. *Vistseral'naya gladkaya myshechnaya tkan'* [Visceral smooth muscle tissue]. Arkhangel'sk, 2001, pp. 107-135.
4. Zashikhin A. L., Agafonov Yu. V., Barmina A. O. Mechanisms of smooth muscle tissue reactivity of the airways in experimental bronchospasm. *Morfologiya (Saint Petersburg, Russia)*. 2009, 136 (6), pp. 69-74. [in Russian]
5. Patent 2104524. *Ros. Federaciya. Sposob poluchenija preparatov izolirovannyh kletok* [Licence 2104524. Rus. Federation. Way of production of single cell preparations]. Zashikhin A. L., Agafonov Ju. V., Lisishnikov L. V., no. 94018751/14, zjavl. 23.05.1994, opubl. 10.02.98, bjul. no. 4, pp. 11-13.
6. Barnes P. J., Cosio M. G. Cells and mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. Monograph*. 2006, 38, pp. 130-158.
7. Dixon J. S., Jen P. Y., Yeng C. K., Gosling J. A. The vesico-ureteric junction in three cases of primary obstructive megaureter associated with ectopic ureteric insertion. *Urol*. 1998, 81 (4), pp. 580-584.
8. Gabella G. Development of visceral smooth muscle. *Results. Probl. Cell Differ*. 2002, 38, pp. 1-37.
9. Halayko A. J., Stelmack G. L., Yamasaki A. Distribution of phenotypically disparate myocytes subpopulations in airway smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2005, 83, pp. 104-116.

10. Hashitani H. Interaction between interstitial cells and smooth muscles in the lower urinary tract and penis. *J. Physiol. published online*. 2006. DOI:10.1113. P. 1-27

11. Lau C. L., Chacko S. Identification of two types of smooth muscle cells from rabbit urinary bladder. *Tissue and cell*. 1996, 28 (3), pp. 339-355.

12. Payabvash S., Kajbafzadeh A-M., Tavangar S. M. Myocyte Apoptosis in Primary Obstructive Megaureters: The Role of Decreased Vascular and Neural Supply. *J. Urol*. 2007, 178, pp. 259-264.

CELLULAR MECHANISMS OF REACTIVITY OF AIRWAY AND URINARY SYSTEM SMOOTH MUSCLE

E. Bashilova, A. Zashikhin, Yu. Agaphonov

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

We have carried out a comparative study of human smooth muscle cells of segments of the bronchial tree and the urinary

system in norm and under functional load and in change of functional load according to the obstructive type. There have been revealed general principles of organization of smooth muscles of these organ systems. Reactive transformation of smooth muscle depends on a type and intensity of the pathogenic factor. It has been shown as an alteration of the cell population structure and metabolic parameters of the smooth muscle in obstructive disturbances.

Keywords: smooth muscle tissue, reactivity

Контактная информация:

Башилова Елена Николаевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 163000, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51

Тел. (8182)28-59-48

E-mail: ebashilova@mail.ru