

УДК 616-008.6:616.231:613.166.9

С.С. Целуйко, М.М. Горбунов,
Н.В. КоршуноваФГБОУ ВО Амурская ГМА
Минздрава России
г. Благовещенск**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ
МЕРЦАТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ТРАХЕИ
В ЗАРАНЕЕ СОЗДАВАЕМЫХ ДЛЯ
ОРГАНИЗМА ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ
УСЛОВИЯХ СРЕДЫ**

Введение. В основе изменений жизнедеятельности организма животных и человека при патологических процессах, состояниях и заболеваниях лежит нарушение функции клеток. Развитию цилиарной дискинезии способствуют как биологические, так и физические факторы, которые могут привести к различным легочным заболеваниям [2, 3, 7].

При действии патогенных факторов происходит дисбаланс между производством окислителя и антиоксидантой защиты, что приводит к накоплению активных форм кислорода. Высокий уровень окислительного стресса вызывает ухудшение функции клетки и разрушение клеточной мембраны [10].

Разрушение клеточных мембран повышает проницаемость эндотелия для иммунных клеток, усиливает воспалительные реакции в эпителии верхних дыхательных путей, что приводит к изменению в их строении. Поврежденные клетки выделяют большое количество биологически активных веществ, воздействующих на здоровые клеточные элементы, окружающие очаг повреждения. Эти биологически активные вещества получили название «медиаторы повреждения». К ним относятся гистамин, серотонин, брадикинин, простагландины, ацетилхолин, адреналин, ферменты. Многие из этих биоло-

Резюме В статье представлены современные методы исследования, проведенные на базе ЦНИЛ АГМА. Они позволяют с легкостью дифференцировать раннее начало заболевания с помощью растровой микроскопии методом замораживания скальвания и напылением золотом поверхности слизистой оболочки трахеи. Кроме того, был проведен контроль срезов с окраской гематоксилин Бемера эозин, который позволяет расширить представления о патологическом процессе в глубине ткани трахеи.

Ключевые слова: мукоцилиарный транспорт, метод замораживания скальвания, патологический процесс.

гически активных веществ способствуют развитию воспалительных и аллергических реакций. На этом фоне происходят функциональные расстройства реснитчатых клеток трахеи в виде дискинезии ресничек мерцательного эпителия и увеличения активности бокаловидных клеток [1, 5].

Возрастание количества бокаловидных клеток усиливает образование слизи, приводящее к уменьшению мукоцилиарного транспорта и образованию слизистой пробки [4]. Мукоцилиарный транспорт, формируемый реснитчатыми клетками, отвечает за эффективное удаление патогенных микробов и вдыхаемых частиц из верхних дыхательных путей. Мерцательные клетки располагаются по всей слизистой оболочке верхних дыхательных путей, образуют мукоцилиарный эскалатор, который обеспечивает защиту против действия повреждающих факторов [9].

Выявление генеза заболеваний разной природы становится возможным лишь при изучении закономерностей изменений, происходящих на уровне молекул, субклеточных структур, клеток, органов, целостного организма [6, 8].

Ранняя диагностика заболеваний органов дыхания с помощью современных методов исследования (метод замораживание-скальвание, растровая и электронная микроскопия) может помочь определить начало заболевания, основным критерием которого будут являться морфофункциональные нарушения активности ресничек мерцательного эпителия, которые могли бы быть пригодной для

MORPHOLOGICAL METHODS OF EARLY DIAGNOSTICS OF DISORDERS OF CILIATED EPITHELIUM OF THE TRACHEA IN EXTREME ENVIRONMENTAL CONDITIONS CREATED FOR THE ORGANISM IN ADVANCE

S.S. Tseluyko, M.M. Gorbunov, N.V. Korshunova

FSBEI HE the Amur state medical Academy of the Ministry of Public Health of Russia, Blagoveshchensk

Abstract The article presents modern research methods conducted on the basis of the Central Scientific Research Laboratory of ASMA. They make it easy to differentiate the early onset of the disease using raster microscopy by freezing spalling and gold spraying the surface of the mucous membrane of the trachea. In addition, the sections were monitored with Bemer hematoxylin eosin staining, which allows to expand the understanding of the pathological process in the depths of the tracheal tissue.

Key words: mucociliary transport, cleavage freezing method, pathological process.

DOI 10.22448/AMJ.2019.3.41-45

исследования респираторных заболеваний, связанных с нарушением мукоцилиарного транспорта в дыхательных путях.

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование было проведено на белых крысах-самцах, охлаждение которых проводили в климатической камере (тип 3001 ILKA, Германия) при температуре -15°C в течение 15 дней по 3 часа ежедневно. Материал экспериментальных исследований (трахея) готовили разными методами. Из кусочков трахеи крыс были изготовлены парафиновые срезы, окрашенные гематоксилин эозином. Изучение проводилось с помощью световой микроскопии и морфометрии на увеличении объектива $\times 100$. Обработка материала

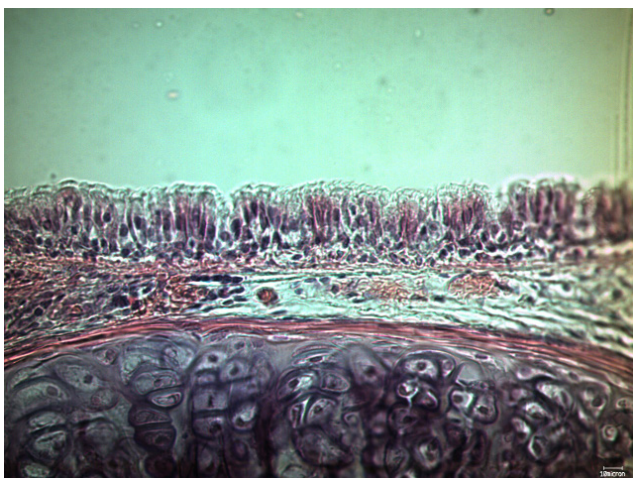


Рисунок 1. Эпителий слизистой оболочки трахеи на поперечном срезе (интактная группа). Клетки правильной формы располагаются по всей базальной мембране. Выявляются реснитчатые бокаловидные и базальные клетки. Окраска: гематоксилин эозин. Увеличение: 200.

для растровой электронной микроскопии проводилась с помощью напыления золотом. Кроме этого применялся метод «замораживание – скалывание», которым исследовалась поверхность слизистой оболочки трахеи. Материал был помещен в жидкий азот -196°C и замораживался в течение 10 минут. После этого орган скалывался острым лезвием бритвы и помещался на столик замораживающей приставки Deben CoolStage. Материал охлаждался до -30°C . Исследование проводилось с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi s-3400.

Результаты исследования

При световой микроскопии на срезах, окрашенных гематоксилин эозином, мы видим, что у интактных животных все клетки эпителиального пласта располагаются на базальной мембране. Среди них выявляются реснитчатые, бокаловидные и базальные клетки (рис.1).

Высота эпителия трахеи у интактных

животных равняется $23,41 \pm 0,74$ мкм. Реснитчатые клетки правильной цилиндрической формы, на апикальных частях располагаются реснички. Высота ресничек около $5,68 \pm 0,14$ мкм. Ядра реснитчатых клеток овальной формы базофильной окраски локализуются ближе к базальной части клетки. Количество реснитчатых клеток на 100 мкм эпителиального пласта равняется $4,7 \pm 0,15$. Бокаловидные клетки имеют форму бокала и их число на 100 мкм эпителия приближается к $2,7 \pm 0,36$. Кроме этого, в эпителии присутствуют и малодифференцированные (базальные) клетки, локализующиеся на базальной мембране и соприкасающиеся с ней своими мембранами. Число базальных клеток на 100 мкм у интактных животных равняется $10,0 \pm 0,25$. Они выполняют регенеративную функцию при физиологических либо патологических процессах, происходящих в эпителии трахеи. Эти клетки с округлой цитоплазмой и ядром занимают практически всю цитоплазму (рис. 1).

Длительное влияние низких температур оказывает отрицательное действие на слизистую оболочку трахеи. Происходит уменьшение высоты эпителиального пласта по сравнению с интактной группой и составляет $17,15 \pm 0,26$ мкм. Высота ресничек реснитчатого эпителия снижается, они деформируются и поэтому создается эффект уменьшения клеток эпителиального пласта в трахее. Высота ресничек в эпителии составляет около $3,91 \pm 0,13$ мкм. При подсчете количества реснитчатых и бокаловидных клеток эпителий приобретает другую картину. Число реснитчатых клеток снижается и составляет $2,6 \pm 0,16$ мкм на 100 мкм эпителиального пласта. Количество бокаловидных клеток возрастает по сравнению с нормой в два раза (рис. 2). Базальные клетки активизируются и их число увеличивается до $11,5 \pm 0,22$ (табл. 1).

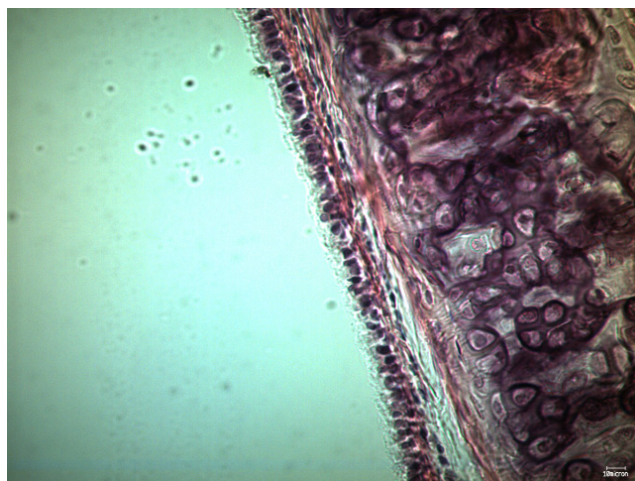


Рисунок 2. Эпителий трахеи при действии холода в течение 15 дней. Происходит снижение эпителия и ресничек. Ядра клеток округляются. Окраска: гематоксилин эозин. Увеличение: 100

При рассмотрении поверхности эпителиального пласта трахеи у интактной

Таблица 1. Морфологические показатели структуры эпителиального пласта трахеи в норме (Мт)

Показатели	Норма	Холод 15 дней
Высота эпителия, мкм	23,41±0,74	17,15±0,26
Высота ресничек, мкм	5,68±0,14	3,91±0,13**
Количество реснитчатых эпителиоцитов на 100 мкм эпителиального пласта	4,7±0,15	2,6±0,16**
Количество бокаловидных клеток на 100 мкм эпителиального пласта	2,7±0,36	5,00±0,33**
Количество базальных клеток на 100 мкм эпителиального пласта	10,0±0,25	11,5±0,22**

Примечание: * - р 0,05, ** - р 0,001 - уровень статистической значимости различий показателей по сравнению с группой интактных животных.

Различия между измеренными показателями рассчитаны непарным критерием Стьюдента. группы с помощью растровой микроскопии и напылении золотом выявляются реснички мерцательных клеток. Они правильной цилиндрической формы, большинство из них собраны в пучки, их концы направлены преимущественно в одну сторону для успешной эвакуаторной функции, без признаков деструкции. Кроме ресничек, на поверхности эпителия промеж верхушек мерцательных клеток обнаруживаются небольшие выпячивания апикальных полюсов бокаловидных клеток, наполненных гранулами секрета (рис. 3).

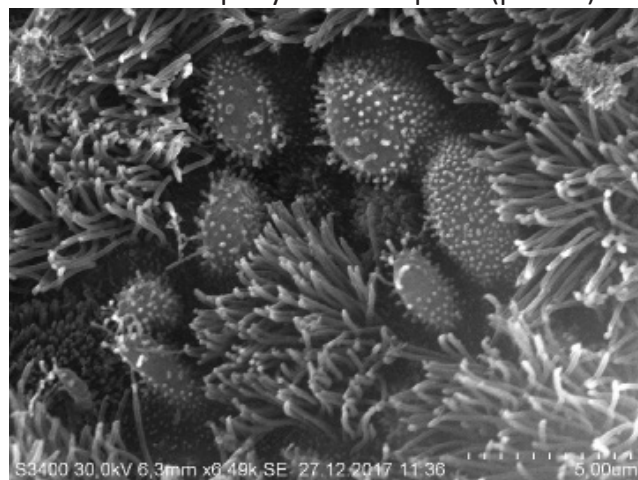


Рисунок 3. Поверхность эпителия трахеи у интактной группы. На снимке видно веерообразное расположение ресничек. Реснички разнонаправлены. Апикальные части бокаловидных клеток гипертрофированны. Имеются микроворсинки. Растровая микроскопия. Увеличение: 6000

При изучении поверхности эпителия с помощью растровой электронной микроскопии выявляется, что апикальный полюс секретирующих клеток выступает над ресничками. Чрезмерное образование гранул приводит к возрастанию секреции слизи. Зачастую такая слизь в особенности на сроке около 15 дней охлаждения насыщена большим количеством

клеточных компонентов, таких, как лейкоциты, эритроциты, макрофаги, слущенные клетки эпителия, содержащие сложную морфологическую картину. Действие холодового стресса приводит к выпячиванию цитоплазм мерцательных клеток с последующим замуровыванием ресничек слизью у апикального полюса. Растровый анализ рельефа реснитчатых клеток выявил большое количество грибовидных выпячиваний (рис. 4).

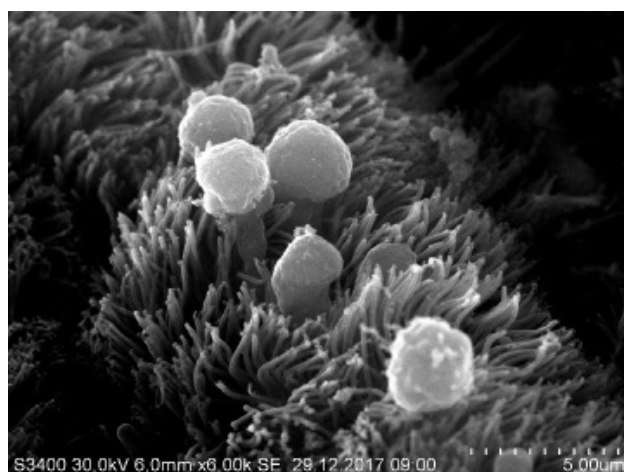


Рисунок 4. Поверхность эпителия трахеи при действии холода в течение 15 дней. На поверхности видны реснички цилиндрической формы и гипертрофированные апикальные полюса бокаловидных клеток в стадии секреции без микроворсинок. Растровая микроскопия. Увеличение 6000.

При исследовании поверхности трахеи крыс у интактных животных, подвергавшихся действию низких температур, с помощью метода «замораживание-скалывание» обращает на себя внимание изменение рельефа слизистой оболочки. Обнаруживается большое волнообразное скопление ресничек эпителия по всей поверхности слизистой оболочки трахеи. Реснички хорошо различимы, имеют правильную форму и каждая из них отделена друг от друга. На фоне разнообразного реснитчатого эпителия выделяются верхушки гипертрофированного апикального полюса бокаловидных клеток,

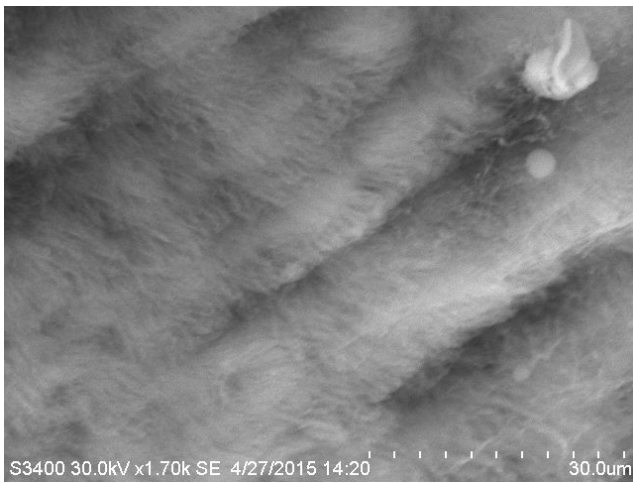


Рисунок 5. Растровая электроннограмма поверхности просвета трахеи. Волнообразное скопление реснитчатого эпителия на поверхности трахеи. Метод «замораживание-скальвание». Увеличение 1700.

лишенных микроворсинок. Эти образования раздвигают реснички мерцательных клеток (рис. 5).

Секреторная активность бокаловидных клеток сопровождается выделением слизи на поверхность эпителия с разрушением апикального полюса. Вследствие этого в слизи нередко обнаруживаются остатки цитоплазматических элементов. Это приводит к тому, что слизь вызывает слипание ресничек вследствие чего они на некоторых участках располагаются группами и при исследовании плохо различимы электронным микроскопом. Картина состояния бокаловидных клеток создает впечатление нарушения секреторной цикличности, так как все слизеобразующие клетки находятся в одной стадии – выделения. Апикальная поверхность мерцательных клеток в условиях гиперсекреции имеет много выбуханий (рис.6).

Обсуждение полученных данных

Реснитчатые клетки, как и бокаловидные, по данным многих авторов, являются основными клеточными элементами, участвующими в мукоцилиарном транспорте [9]. Высота эпителия трахеи в течение всего эксперимента уменьшилась по сравнению с нормой в течение 15 дней на 26%. Высота ресничек эпителия трахеи в течение холодового воздействия снизилась на 31% по сравнению с интактной группой. Это является признаком структурной перестройки реснитчатых клеток в результате гипотермического влияния и проявляется в изменении метаболических процессов внутри клеточных органоидов, что приводит к снижению слизистой части эпителия трахеи.

Нарушается клеточный состав эпителия трахеи путем замещения реснитчатых клеток бокаловидными. Число реснитчатых клеток снижается по сравнению с интактной группой на 44%. Апикальные части бокаловидных

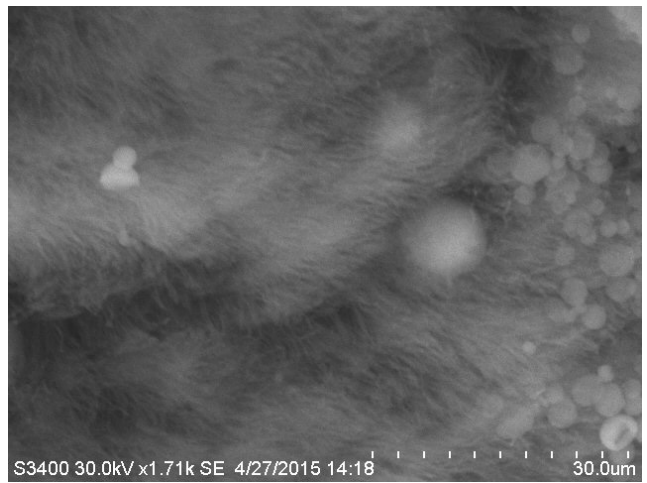


Рисунок 6. Растровая электроннограмма поверхности просвета трахеи. Стадия гиперсекреции. Увеличенные полюсы бокаловидных клеток значительно выступают над поверхностью эпителия. Метод «замораживание – скальвание». Увеличение 1700.

клеток расширяются в результате образования большого количества гранул секрета. Число бокаловидных клеток значительно возрастает по сравнению с интактной группой и на 15-й день охлаждения их количество увеличивается в два раза, что говорит о начале патологической реакции с образованием слизи на поверхности трахеи.

Значительное увеличение бокаловидных клеток и их гиперфункция является фактором, запускающим усиленное слизиобразование с формированием слизистых тяжей по всей поверхности эпителия, нарушая тем самым эвакуаторную функцию реснитчатого эпителия. Мы видим, что происходит усиление обменных процессов в базальных клетках.

Происходит заметная активизация малодифференцированных клеток с повышением количества базальных клеток на 15-й день на 15% по сравнению с интактными животными. Эти процессы являются компенсаторной реакцией, происходящей в пораженном эпителии: малодифференцированные клетки готовы дифференцироваться в нужные клетки для сохранения эпителия слизистой оболочки трахеи, что согласуется с многочисленными исследованиями, проведенными на тканях при действии на нее патогенных факторов [4, 8].

Выводы

Представленные нами экспресс методы, применяемые для изучения слизистой оболочки трахеи, показывают их эффективность при обнаружении начала заболевания. Морфологические нарушения, возникающие на поверхности мерцательного эпителия слизистой оболочки

трахеи, являются, по сути, отражением начала патологической реакции, которая формируется в глубине органа. Поэтому ранняя диагностика по обнаружению патологических изменений реснитчатого эпителия трахеи может дополнить уже существующие методы исследования и позволит в дальнейшем начать раннюю терапию по предотвращению развития патологического процесса в верхних дыхательных путях.

Литература

1. Адо А.А., Ишимова Л.М. Патологическая физиология. // 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина. 1980. С. 520
2. Афанасьев М.А., Кузнецов С.Л. Эффекты реальной и моделируемой микрогравитации на некоторые структурно-метаболические параметры скелетных мышц. // 2013. С. 47-51.
3. Баранов В.М., Донина Ж.А. Моделирование соотношений биомеханики дыхания и гемодинамики в условиях нормальной гравитации и в невесомости. // 2015. С. 144-149.
4. Луценко М.Т. Действие жестких климатических условий северо-востока России на состояние бронхиальных путей жителей Чукотки // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2017. Вып.63. С.53-60.
5. Луценко М.Т. Мукоцилиарная активность реснитчатого эпителия бронхов у больных бронхиальной астмой до и после лазеротерапии /М.Т. Луценко, В.Б. Приходько, А.Н. Одиреев, А.А. Галигберов // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 1999. Вып. 4. С. 49-53.
6. Целуйко С.С. Гистология дыхательной системы человека: монография / С.С. Целуйко. Благовещенск: АГМА, 2007. 36 с.
7. Целуйко С.С. Ультраструктурная организация мукоцилиарного клиренса в норме и при холодовых воздействиях // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2009. Вып. 33. С. 7-12.
8. Целуйко С.С., Зиновьев С.В., Горбунов М.М., Решодько Д.П. Растровая криоэлектронная микроскопия легких у крыс при холодовом воздействии // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2016. Вып. 62. С. 47-52.
9. Шабалин В.В. Двигательная активность ресничек мерцательного эпителия при нарушении мукоцилиарного транспорта у человека: Дисс. канд. наук. СПб., 2002. 102 с.
10. Шаповаленко Н.С., Доровских В.А., Целуйко С.С., Сластин С.С., Чжоу С.Д., Ли Ц. Морфофункциональные изменения трахеи при холодовом стрессе на фоне введения реамберина и элеутерококка // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2011. Вып. 39. С. 33-39.

Статья поступила в редакцию 24.09.2019

Координаты для связи

Целуйко Сергей Семенович, д. м. н., профессор, проректор по научной работе, зав. кафедрой гистологии с биологией ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Горбунов Михаил Михайлович, к. б. н., м. н. с. ЦНИЛ ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Коршунова Наталья Владимировна, д. м. н., зав. кафедрой общей гигиены ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Почтовый адрес ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России: 675000, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Горького, 95.
E-mail: AmurSMA@AmurSMA.su, science.dep@AmurSMA.su