

УДК 576.31(611.231:616-001.18-092.9)615.32

Н.С.Шаповаленко¹, В.А.Доровских¹, С.С.Целуйко¹, С.С.Сластин¹, С.Д.Чжоу², Ц.Ли²**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТРАХЕИ КРЫС ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ РЕАМБЕРИНА И ЭЛЕУТЕРОКОККА**¹ГОУ ВПО Амурская государственная медицинская академия Минздрава России, Благовещенск, Россия²Отдел респираторной медицины второй госпитальной клиники Чунцинского медицинского университета, КНР**РЕЗЮМЕ**

Проведено исследование морфофункциональных изменений трахеи крыс, подвергнутых длительному холодному воздействию, а так же на фоне введения реамберина в сравнении с классическим адаптогеном элеутерококком. Полученные результаты свидетельствуют о защитном влиянии исследуемых препаратов на мукоцилиарный аппарат трахеи крыс и выраженном цитопротекторном воздействии реамберина на эпителиальный покров слизистой оболочки трахеи.

Ключевые слова: морфология, трахея, холод, стресс, антиоксиданты.

SUMMARY

N.S.Shapovalenko, V.A.Dorovskikh, S.S.Tseluyko, S.S.Slustin, X.D.Zhou, Q.Li

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN RATS TRACHEA AT COLD STRESS AGAINST REAMBERIN AND ELEUTHEROCOCCUS INTRODUCTION

The study of morphofunctional changes in trachea of rats exposed to long cold influence and reamberin introduction in comparison with eleutherococcus was carried out. The received results suggest the protective action of investigated medications on mucociliary apparatus of rat trachea and intensive citoprotective action of reamberin on epithelial integument of trachea mucosa.

Key words: morphology, trachea, cold, stress, antioxidants.

Главный неблагоприятный климатический фактор, с которым приходится сталкиваться населению Дальневосточного региона – холод [3, 11]. Адаптация к холодному воздействию представляет собой длительный процесс, который может продолжаться до 5-7 лет и сопровождается целым рядом функциональных и морфологических нарушений различных органов [1, 10]. Известно, что морфологические изменения при холодной адаптации обусловлены нарушением целостности клеточных мембран, активированием перекисного окисления липидов, нарушением антиоксидательной активности липидов, напряжением кислородного режима, изменением реологических свойств крови и другими причинами. Всё это неизбежно приводит к снижению работоспособности и продолжительности жизни человека [3].

Указанные изменения в первую очередь затрагивают дыхательную систему. Это связано с тем, что органы дыхания непосредственно контактируют с холодным воздухом, их значительно сложнее предохранять от его действия и поэтому они наиболее часто страдают от действия низких температур [3, 7, 13].

Есть два пути решения проблемы защиты органов дыхания от холодного воздействия. Первый – создание теплоизолирующей одежды с подогревом, использование масок, скафандров и т.д., но все эти устройства ограничивают движения, возможность выполнения трудовых манипуляций [3]. Второй путь – изыскание биологически-активных веществ и разработка на их основе фармакологических препаратов, способных облегчить процесс адаптации. К сожалению, круг таких веществ ограничен, многие из них не изучены и мало удовлетворяют запросы клинической медицины [3, 4, 9].

Цель данного исследования: изучить морфофункциональное состояние мукоцилиарного аппарата трахеи при холодном стрессе у экспериментальных крыс, установить характер и степень влияния реамберина и элеутерококка на слизистую оболочку трахеи лабораторных животных в условиях длительного воздействия низких температур.

Материалы и методы исследования

Для изучения действия реамберина в условиях низких температур была применена холодная модель эксперимента [5], в которой участвовало 212 беспородных половозрелых белых крыс-самцов массой 200 г. Животные были разделены на 4 группы, по 10 крыс в каждой: интактные животные, которые находились в обычных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище с соблюдением светового и температурного режима; контрольная группа, где крысы подвергались ежедневному охлаждению в климатокамере «Fentron» (Германия) по 3 часа при температуре -15°C; животные, которым перед охлаждением внутривенно вводили реамберин в дозе 30 мг/кг; животные, которые перед охлаждением получали водный раствор элеутерококка *per os* в дозе 10 дг/кг. Исследование проводилось одновременно во всех экспериментальных группах в течение 28 дней, декапитация животных производилась на 7, 14, 21 и 28 день эксперимента. Морфологическая структура трахеи была изучена во всех экспериментальных группах с использованием просвечивающей и растровой микроскопии. Микроскопирование и фотографирование осуществлялось на

фотомикроскопе «Microphot-FXA» (Nicon, Япония). Полутонкие и ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-NOWA (Швеция), исследование полутонких срезов использовали как самостоятельный морфологический метод. Ультратонкие срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе «Technai G2 Spirit TWIN» (Голландия) и растровом электронном микроскопе «Hitachi S 3400» (Япония).

Протокол экспериментальной части исследования на этапах содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из опыта соответствовал принципам биологической этики, изложенным в международных регламентирующих документах. Исследование одобрено Этическим комитетом Амурской государственной медицинской академии.

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что система органов дыхания одной из первых реагирует на снижение температуры окружающей среды [10, 12]. Морфофункциональные повреждения в структуре трахеи появляются в результате усиления организмом теплопродукции в условиях хо-

лодового стресса. Увеличение теплопродукции достигается путем стимуляции процессов сократительного и несократительного термогенеза, чему способствует активация симпатoadренальной системы [2, 6].

В условиях длительной холодовой нагрузки в системе дыхания происходит структурная перестройка за счет усиленной васкуляризации трахеи и крупных бронхов [8]. Холодовой стресс индуцирует усиление продукции катехоламинов, следствием чего является активация липолиза, разобщение окислительного фосфорилирования, усиление генерации активных метаболитов кислорода и процессов перекисного окисления липидов. Это приводит к нарушению структуры клеточных мембран, снижению функциональной активности клеток и их гибели [4, 11].

В результате морфологических исследований эпителия трахеи мы получили картину, свидетельствующую о том, что при длительном вдыхании охлаждённого воздуха происходит перестройка эпителия. Это, прежде всего, выявляется при изучении поверхности эпителия – нарушается регулярное расположение ресничек (рис. 1).



Рис. 1. Поверхность эпителиальной выстилки трахеи крыс при вдыхании охлаждённого воздуха. Нарушение мукоцилиарного транспорта вследствие «склеивания» ресничек. Нарушение поперечных волн движения ресничек. А, Б – растровые электронограммы, увеличение: 1000, 3500. В – электронограмма, увеличение: 20000.

В одних случаях образуются скопления ресничек, в других – направление ресничек в различные стороны приводит к исчезновению поперечных волн их движения, хорошо различимых у интактных животных. Кроме того, важным морфологическим признаком, отражающим действие холода, является увеличение количества слизи и клеточных элементов на поверхности эпителия – гиперсекреция эпителия трахеи. Это подтверждается увеличением количества слизи на поверхности трахеи и изменением соотношения реснитчатых и бокаловидных клеток (рис. 2). Вторым признаком регенерации эпителия трахеи на действие холода является значительное увеличение в слизистой оболочке мигрирующих элементов, увеличивающих скорость обменных процессов в эпителии. Это приводит к значительно ускоренной дифференцировке эпителия,

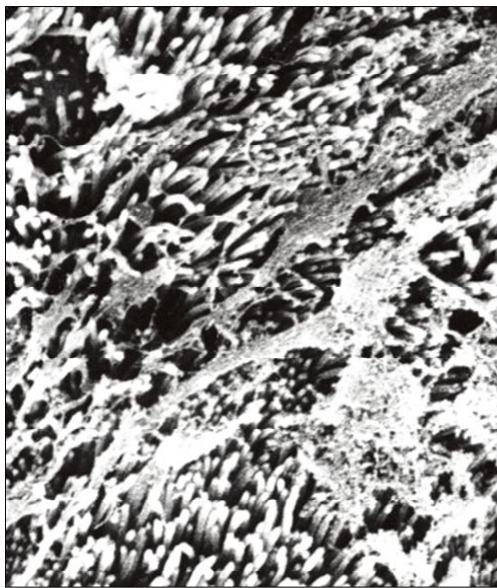


Рис 2. Поверхность эпителиальной выстилки трахеи крыс при охлаждении. «Склеивание» ресничек мерцательного эпителия. Растровая электронограмма. Увеличение: 5000.

Следует отметить наличие изменений и со стороны щетинчатых клеток, которые претерпевают качественные изменения – уменьшается высота их микроворсинок, усиливается контактирование с бокаловидными клетками, увеличивается количество гранул секрета над щетинчатыми клетками.

При исследовании влияния реамберина на эпителий слизистой оболочки трахеи крыс на фоне действия холода нами установлено определенное защитное действие препарата.

Так, при электронной микроскопии эпителия слизистой трахеи не выявлено признаков его повреждения, характерных для холодового воздействия. Не обнаружено нарушения регулярности расположения

что отражается в наших экспериментах (рис. 3). Под действием холода происходит уменьшение количества промежуточных (в 2 раза) и базальных клеток и, как следствие, увеличение количества бокаловидных клеток (рис. 4). При этом нами отмечена активация синтеза гликопротеидов в виде наличия в апикальной части отдельных бокаловидных клеток значительного скопления гликопротеидов. Апикальная поверхность выступает над ресничками, образуя «купола», лишённые микроворсинок. Увеличение выработки слизи нередко приводит к разжижению и в большей части бокаловидных клеток вместо выпячивания образуется «кратер», куда выделяется более жидкий секрет, вследствие этого при растровой микроскопии вначале создаётся впечатление уменьшения количества бокаловидных клеток.



Рис. 3. Увеличение количества «мелкопористой» слизи на поверхности ресничек при охлаждении. Растровая электронограмма. Увеличение: 5000.

ресничек, исчезновения поперечных волн движения ресничек (рис. 5). Реснитчатый покров сохранил характерный волнообразный рельеф, хотя на поверхности ресничек в небольшом количестве выявились клеточные элементы и слизь. При ультраструктурном анализе органоидов реснитчатых клеток отмечено их нормальное строение.

Вместе с тем следует обратить внимание на характер осмиофильности матрикса митохондрий. У митохондрий, расположенных в апикальном полюсе клеток, часто при нормальном строении выявляется сплошной осмиофильный матрикс. Некоторые митохондрии имеют начальные стадии вакуолизации.

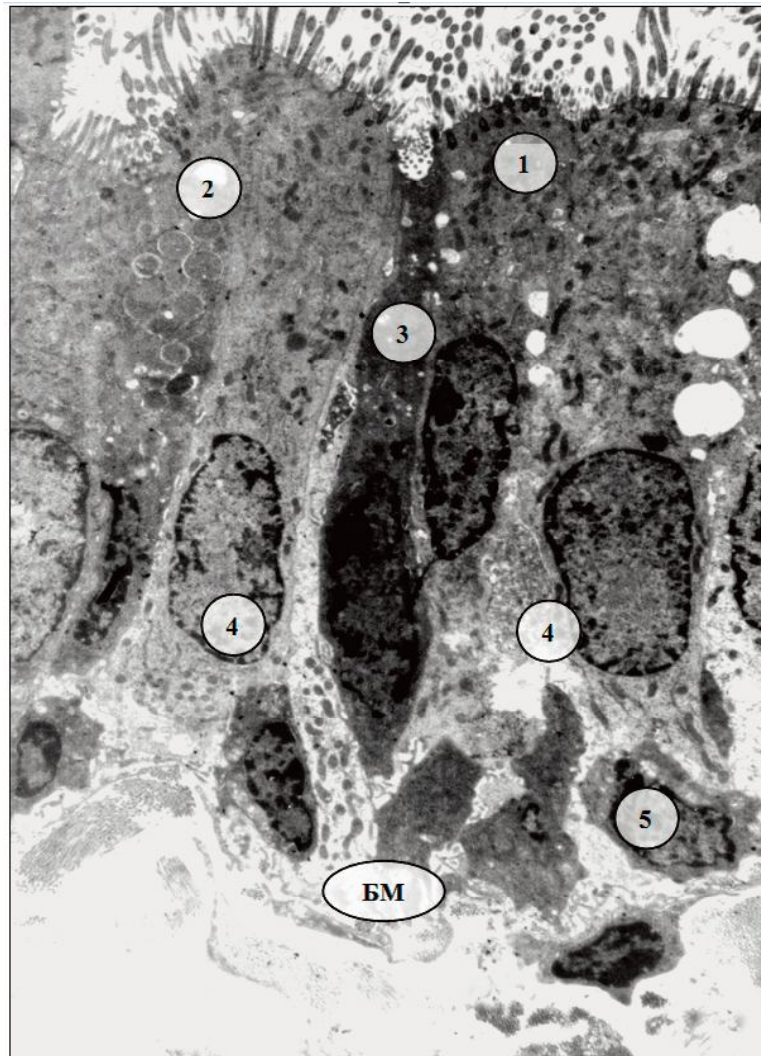


Рис. 4. Эпителий трахеи крыс при действии холода. Большая часть клеток становится электронно-плотной. Реснитчатые (1), бокаловидные (2), промежуточные (3), базальные (5), мигрирующие клетки (4), базальная мембрана (БМ). Электронограмма. Увеличение: 1500.

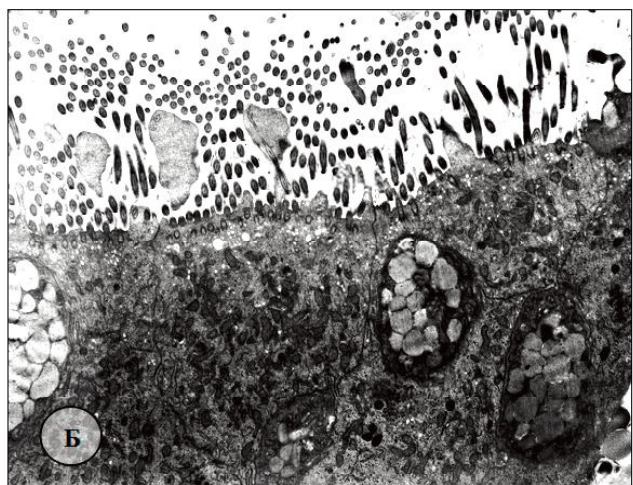


Рис. 5. Слизистая оболочка трахеи при холодовом воздействии на фоне реамберина у крыс. Реснитчатый покров сохранил характерный нормальный план строения. А – окраска гематоксилин-эозин, увеличение: 120. Б – электронограмма, увеличение: 3500.

При анализе секреторной активности бокаловидных клеток установлено характерное обилие гранул секрета в апикальном полюсе и отсутствие его на поверхности клеток. При растровой электронной микроскопии поверхность бокаловидных клеток не отличается от таковой у интактных крыс. Бокаловидные клетки встречаются чаще группами (по 5-10 клеток), на поверхности выявляется большое количество мелких микроворсинок.

При просвечивающей электронной микроскопии определяются бокаловидные клетки обычных размеров с большим количеством гранул, имеющих различную электронную плотность. Клеточный состав и морфометрические показатели слизистой оболочки при сочетанном действии реамберина и холода существенных отличий от нормы не имели.

На рисунке 6 представлены фотографии слизистой оболочки крысы, подвергнутой холодовому воздействию в сочетании с введением реамберина. Предварительное введение препарата предупреждает изменения слизистой трахеи, характерные для влияния холода. Слизистая оболочка таких животных, как по морфологическому строению, так и по клеточному составу незначительно отличается от таковой у интактных крыс.

В опытах на крысах, подвергнутых длительному холодовому воздействию, изучено влияние вводимого *per os* элеутерококка на мукоцилиарную систему тра-

хеи животных.

Следует отметить, что элеутерококк при введении *per os* на ранних этапах эксперимента не оказывал защитного действия. Так, несмотря на введение препарата, наблюдаются нарушения мукоцилиарного транспорта вследствие «склеивания» ресничек, столь характерного для холодового воздействия. Однако нарушение поперечных волн движения ресничек было не столь выраженным, как при действии холода, и хотя на поверхности слизистой оболочки наблюдается увеличение «мелкопористой» слизи, ее количество значительно меньше, чем при холодовом воздействии (рис. 7).

При этом, на поверхности ресничек слизистой оболочки практически не наблюдается форменных элементов, столь характерных для действия холода. Бокаловидные клетки увеличены в размерах, хотя их гиперплазии нет. Лишенные микроворсинок апикальных полюсов бокаловидных клеток выступают над поверхностью реснитчатых клеток (рис. 7).

В таблице представлены результаты морфометрического исследования структуры слизистой оболочки трахеи у животных в различных группах.

Установлено, что при введении элеутерококка на фоне холодового воздействия происходит повышение количества базальных и промежуточных клеток, что приводит к увеличению базального слоя.

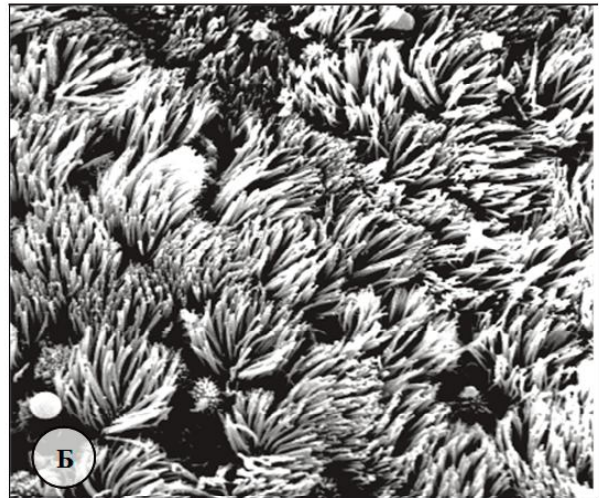
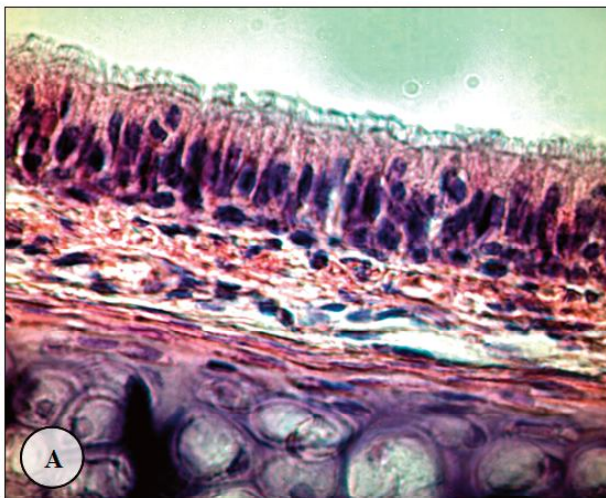


Рис. 6. Поверхность слизистой оболочки трахеи крыс при действии холода на фоне реамберина. Практически нормальное строение слизистой. Между ресничками выделяется апикальные полюса бокаловидных клеток с большим количеством микроворсинок. А – окраска гематоксилин-эозин, увеличение: 450. Б – растровая электроннограмма, увеличение: 2500.

Кроме того, повышается общее количество клеток, что увеличивает высоту эпителия до $30,1 \pm 2,1$ мкм (при норме $18,3 \pm 1,0$ мкм, $p < 0,001$).

Существенные положительные изменения при длительном введении элеутерококка выявлены в реснитчатых клетках. Во-первых, доля «тёмных» клеток приближается к показателям у интактных животных (на одну «тёмную» клетку приходится три «светлых»), хотя и отмечается уменьшение их процентного соот-

ношения до 37,7%. Во-вторых, в апикальной части реснитчатых клеток происходит просветление гиалоплазмы и уменьшение количества электронно-плотных митохондрий. В надъядерной зоне хорошо выделяется развитый комплекс Гольджи. Ядерная и базальная зона реснитчатых клеток характеризуется восстановлением ультраструктуры, характерной для интактных крыс.

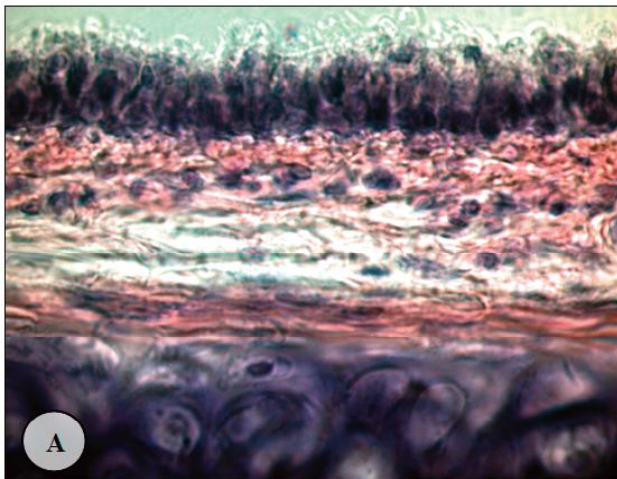


Рис. 7. Поверхность трахеи при охлаждении и введении элеутерококка. Количество секретирующих бокаловидных клеток увеличено. А – окраска гематоксилин-эозин, увеличение: 450. Б – растровая электронограмма, увеличение: 3000.

Таблица

Сравнительная характеристика морфометрических показателей слизистой оболочки трахей крыс при охлаждении и на фоне введения элеутерококка

Структура слизистой оболочки трахеи		Вид эксперимента		
		Интактные животные	Воздействие холодом	Холод и элеутерококк
Клетки покровного эпителия, %	реснитчатые	52,3	52,6	37,7
	бокаловидные	11,5	14,7	13,2
	промежуточные	10,6	4,4	11,3
	базальные	21,3	15,5	30,2
	щетинчатые	2,0	2,0	3,4
Клетки, мигрирующие к подлежащей соединительной ткани, %		2,3	10,3	3,8
Ширина базальной пластинки, мкм		3,2±0,2	4,0±0,3	3,8±0,3
Высота эпителиального пласта, мкм		18,3±1,0	20,1±1,6	30,1±2,1
Отношение количества реснитчатых клеток к бокаловидным		1:4,5	1:3,5	1:2,8

Следует отметить, что на фоне введения элеутерококка характер слизиобразования – важнейшего звена в адаптации слизистой оболочки к действию холода, остаётся на высоком уровне. Так, при незначительном уменьшении содержания бокаловидных клеток (до 13,2%) отмечается повышение слизиобразования. На боковых поверхностях трахеи обширные поля бокаловидных клеток участвуют в выработке секрета. Соотношение реснитчатых и бокаловидных (рис. 8) клеток составило 1:2,8, что о повышенном образовании слизи. Мы считаем, что способность элеутерококка нормализовать процентное соотношение клеточных элементов в эпителии связано, по-видимому, с повышенной регенерационной способностью последнего.

В наибольшей степени стимулирующая роль элеутерококка проявляется в отношении образования рес-

ничек и микроворсинок у реснитчатых клеток. Установлено, что по своей защитной активности элеутерококк, вводимый *per os*, оказывал защитное действие на реснитчатый аппарат, но в сравнении с реамберином значительно ему уступал в нормализации функции бокаловидных клеток.

Так, введение элеутерококка не приводило к уменьшению слизиобразования, не в полной мере наблюдалось уменьшение количества эпителиальных элементов на поверхности слизистой, на отдельных ее участках отмечалось увеличение числа бокаловидных клеток, отсутствие регулярных волн движения ресничек. Всё это позволило нам сделать вывод о том, что элеутерококк не оказывает выраженной защиты от холода на мукоцилиарный аппарат слизистой оболочки трахеи и в этом уступает по активности реамберины.

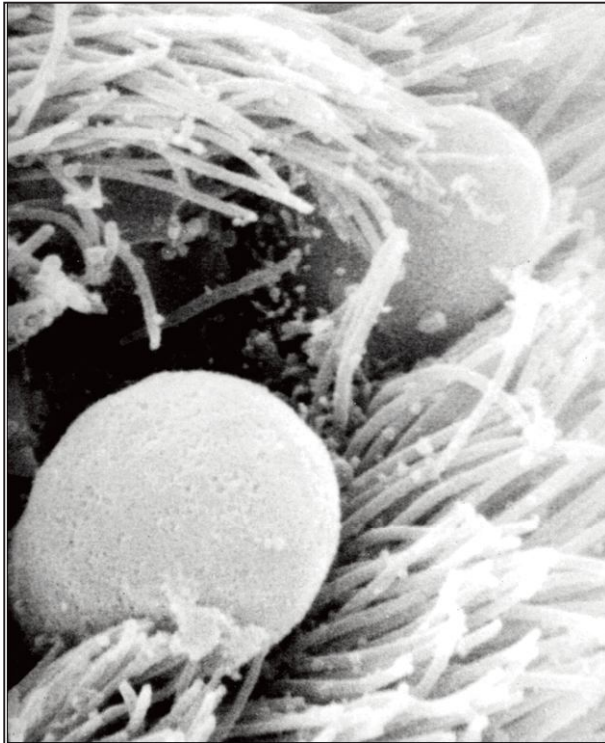


Рис. 8. Поверхность трахеи при охлаждении и введении элеутерококка. Количество секретирующих бокаловидных клеток увеличено. Выявляется гипертрофия апикальных полюсов бокаловидных клеток. Растровая электронограмма, увеличение: 6900.

Таким образом, реамберин оказался весьма эффективным средством защиты мукоцилиарного аппарата крыс при длительном холодовом воздействии. Вместе с тем, поскольку влияние холода инициирует механизмы, приводящие к повреждению слизистой трахеи, то необходимо иметь на вооружении не только препараты, способные сохранять клеточные структуры, но и вещества, способные восстанавливать повреждённые ткани. В этом отношении элеутерококк обладает стимулирующим регенерацию свойством, но не оказывает выраженного цитопротекторного действия на эпителиальный покров слизистой оболочки трахеи. Мы предполагаем, что в случае совместного использования элеутерококка и реамберина можно будет рекомендовать выпуск препарата в виде биологически-активной добавки, обладающей свойством предотвращать негативное влияние длительного холодового воздействия на слизистую оболочку дыхательных путей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-91160).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гистология, цитология и эмбриология: учебник / Афанасьев Ю.И. [и др.]. М.: Медицина. 2001. 744 с.
2. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / Волчегорский И.А. [и др.]. Челябинск, 2000. 167 с.
3. Гришин О.В., Устюжанинова Н.В. Дыхание на севере. Новосибирск: Art-Avenu. 2006. 245 с.
4. Доровских В.А., Бородин Е.А., Штарберг М.А. Фосфолипиды как антиатеросклеротические лекарственные средства // Липопротеиды. Благовещенск, 1995. С.33
5. Доровских В.А. Фармакологическая коррекция холодового воздействия в эксперименте: дис. ... докт. мед. наук. Благовещенск, 1987. С.55–56.
6. Адаптогены и холодовый стресс: вчера, сегодня, завтра / Доровских В.А. [и др.]. Благовещенск: ДальГАУ, 2006. 214 с..
7. Косолапов В.А., Островский О.В., Спасов А.А. Антиоксидантная защита и перекисное окисление липидов в тканях крыс после гипобарической оксигенации // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1998. №11. С.519–521.
8. Красавина Н.П., Целуйко С.С., Гордиенко Е.Н. Структурные изменения соединительной ткани органов дыхания крыс в различные периоды после прекращения действия низких температур // Эколого-физиологические механизмы адаптации: материалы IX междунар. конф. М., 2000. С.110-111.
9. Костюченко А.Л., Семиголовский Н.Ю. Современные реальности клинического применения антигипоксантов // ФАРМиндекс практик. 2002. №3. С.102–122.
10. Луценко М.Т. Дыхательная система // Руководство по гистологии: в 2-х т. / под. ред. В.Л.Быкова, Р.К. Данилова, А.И.Одинцова. Спб.: СпецЛит. 2001. Т.2, С.194–226.
11. Целуйко С.С., Доровских В.А., Красавина Н.П. Морфологическая характеристика соединительной ткани органов дыхания при общем охлаждении. Благовещенск: АГМА, 2000. 25 с.
12. Яковлев А.Ю. Реамберин в практике инфузионной терапии критических состояний. Практические рекомендации. Спб., 2008. 32 с.
13. Ross M.H., Romrell L.J., Kaye G.I. Histology: a text and atlas. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1995. 823 p.

Поступила 28.01.2011

*Наталья Сергеевна Шаповаленко, аспирант,
675000, г. Благовещенск, ул. Горького 95;
Natalia S. Shapovalenko,
95 Gorkogo Str., Blagoveshchensk, 675000;
E-mail: agma@amur.ru*