

УДК 616.231:616.001.18]616-003.96

ПЛАНИМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ТРАХЕИ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ ОРГАНИЗМА

А.В.Прокопенко¹, С.С.Целуйко¹, А.С.Долгополов¹, С.Д.Чжоу², Ц.Ли², В.П.Мишук¹, С.Ю.Ландышев¹¹Амурская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ,
675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95²Вторая госпитальная клиника Чунцинского медицинского университета, КНР,
400010, г. Чунцин, ул. Линьцзян, 76

РЕЗЮМЕ

Изучалась морфологическая и морфометрическая характеристика реснитчатых клеток эпителия слизистой оболочки трахеи белых крыс при охлаждении организма. Три группы лабораторных животных охлаждали по 3 часа в сутки при -15°C в течение 7, 14 и 21 дня. После эксперимента изготавливались препараты из парафиновых срезов. При световой микроскопии измерялись планиметрические показатели эпителиального пласта в материале от экспериментальных и интактных животных. Измеренные величины в экспериментальных группах сравнивались с показателями интактной группы. Установлено, что при 7-дневном охлаждении высота эпителия уменьшалась на 33%, площадь и округлость реснитчатых клеток увеличивались относительно интактной группы на 48 и 49%, соответственно. При 14-дневном охлаждении высота эпителия уменьшалась на 51%, площадь реснитчатых клеток снизилась на 59%, а округлость уменьшилась на 25%. Трёхнедельное охлаждение вызвало уменьшение высоты эпителия на 34%. Площадь реснитчатых клеток была меньше контрольной на 39%. Округлость превышала контрольную лишь на 4%. Эти изменения размеров и формы эпителиальных клеток подтверждали наблюдавшуюся морфологическую картину интенсификации и последующего угнетения метаболизма в ответ на низкотемпературные условия.

Ключевые слова: эпителий слизистой оболочки трахеи, охлаждение организма, адаптация дыхательной системы, морфометрия, планиметрия.

SUMMARY

TRAHEAL EPITHELIUM PLANIMETRIC MODIFICATIONS IN BODY COOLING

A.V.Prokopenko¹, S.S.Tseluyko¹, A.S.Dolgoplov¹,
X.D.Zhou², Q.Li², V.P.Mishuk¹, S.Yu.Landyshev¹¹Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str.,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation²The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical
University, 76 Linjiang Road, Chongqing, 400010, China

A morphological and morphometric characteristic of ciliated epithelial cells of the tracheal mucosa of albino rats during cooling of the body was studied. Three groups of laboratory animals were cooled during 3 hours a day at -15°C for 7, 14 and 21 days. Then specimens were prepared from paraffin sections. Planimetric values of the epithelial layer in the material from the

experimental and intact animals were measured by light microscopy. The obtained values in the experimental groups were compared with the values of intact group. It was found that at 7-day cooling epithelial height reduced by 33%; the size and roundness of ciliated cells increased by 48% and 49%, respectively, in comparison with the intact group. At 14-day cooling the height reduced by 51%, the area of ciliated cells decreased by 59%, and the roundness decreased by 25%. A three-week cooling caused a reduction in the height of the epithelium by 34%. The area of ciliated cells was less than the control by 39%. The roundness exceeded the control by only 4%. These changes of the size and shape of the epithelial cells confirmed the morphological differences in intensification and following metabolism inhibition in response to low temperature conditions.

Key words: tracheal mucosa epithelium, cooling of the body, airway adaptation, morphometry, planimetry.

Жизнедеятельность организма практически невозможна без способности адаптироваться к климату его географического ареала в необходимом и достаточном для этого диапазоне реакции [2]. Одной из систем организма, способной функционировать как при положительной, так и при отрицательной температуре окружающей среды, являются органы дыхания [4]. Очевидно, что механизмы приспособления к температурным колебаниям должны реализовываться уже на границе с воздушной средой [4, 11]. Из множества звеньев компенсаторно-приспособительных механизмов подчас трудно сразу выделить принципиальные структуры, чтобы выработать правильный диагностический и терапевтический подход. Поэтому в представленном исследовании было задумано оценить морфометрические показатели клеток в эпителии слизистой оболочки трахеи для объективизации проявления адаптации воздухоносных путей при воздействии холода на организм.

Материалы и методы исследования

В исследовании участвовало 12 особей половозрелых самцов белых крыс. Лабораторные животные содержались в стандартных условиях вивария. Протокол эксперимента на этапах содержания животных, моделирования переохлаждения организма воздействием низкой температуры окружающей среды на организм, выведения животных из опыта проходил с учётом требований к принципам биологической этики, изложенных в международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использова-

нием животных (1985), Европейской конвенции о защите животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), Приказа МЗ СССР №755 от 12.8.1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», Приказа МЗ РФ №267 от 19.6.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование одобрено этическим комитетом Амурской государственной медицинской академии.

Было сформировано 4 группы животных, в каждую группу взято по 3 особи половозрелых самцов для исключения какого-либо нежелательного влияния эстрального цикла на ход эксперимента. Контрольную группу составили интактные крысы, которых содержали в стандартных условиях вивария. В остальных группах животных подвергали холодовому (при -15°C) воздействию по 3 часа в сутки на протяжении 7, 14 и 21 дня. Для моделирования температурных режимов использовали климатокамеру Elke-Foetron (Германия).

На этапах 7, 14 и 21 дня эксперимента материалом служили по 3 животных в каждой из указанных групп. При завершении исследований выведение животных из опыта проводили путем декапитации с соблюдением требований гуманности согласно Приложению №4 «О порядке проведения эвтаназии умерщвления животного» к Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к Приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977).

Из тканей трахеи крыс были изготовлены поперечные тонкие парафиновые срезы, окрашенные гематоксилин-эозином, для световой микроскопии и морфометрии на увеличении объектива $\times 100$. С помощью морфометрической программы Optika Vision на препаратах измерялись линейные и площадные характеристики эпителиальных клеток [1]. После морфометрии в пакете программ Statistica 6.0 проверялась нормальность выборок оценением коэффициентов асимметрии и эксцесса, и критерия Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении переменных гипотезу о равенстве выборочных средних проверяли непарным t -критерием Стьюдента-Фишера. Поиск зависимостей в экспериментальных данных проводили дисперсионным анализом (ANOVA). Статистическая взаимосвязь измеренных величин определялась корреляционным анализом. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [5].

Результаты исследования

Микроскопическое исследование показало, что в полученном материале структурная организация слизистой оболочки крыс не отличалась от общего плана строения, известного у млекопитающих [10]. В группе интактных животных средняя высота эпителия составляла около 29,72 мкм. Высота ресничек в среднем составила 4,5 мкм, площадь реснитчатых клеток – 238,46 мкм².

В материале из экспериментальных групп наблюдались явные морфологические изменения эпителия слизистой оболочки трахеи.

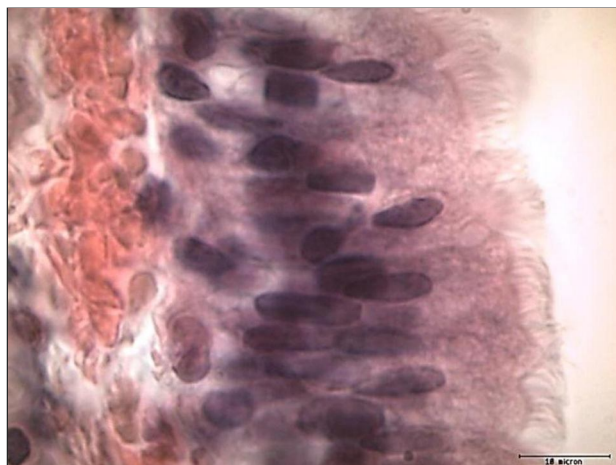


Рис. 1. Эпителий слизистой оболочки трахеи на поперечном срезе (группа 7-дневного охлаждения). Окраска: гематоксилин-эозин. Мерный отрезок 10 мкм. Увеличение: 100.



Рис. 2. Эпителий слизистой оболочки трахеи на поперечном срезе (группа 14-дневного охлаждения). Окраска: гематоксилин-эозин. Мерный отрезок 10 мкм. Увеличение: 100.

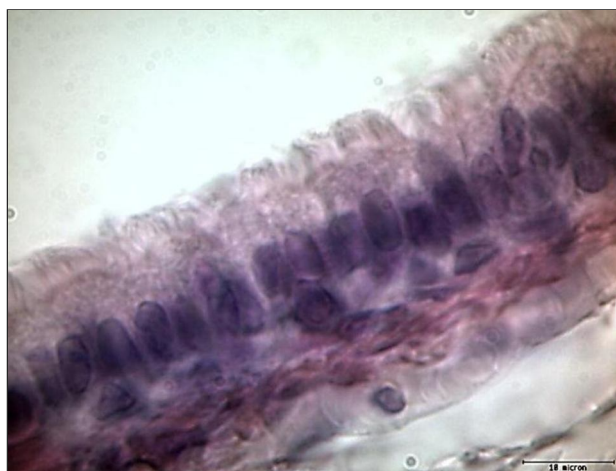


Рис. 3. Эпителий слизистой оболочки трахеи на поперечном срезе (группа 21-дневного охлаждения). Окраска: гематоксилин-эозин. Мерный отрезок 10 мкм. Увеличение: 100.

У животных после 7-дневного охлаждения эпителиальный пласт отличался в первую очередь своей уменьшенной высотой в среднем до 19,99 мкм. Кайма приобрела умеренную волнообразную неровность (с периодом около 20 мкм). Форма клеток имела тенденцию к округлению (рис. 1).

Площадь реснитчатых клеток увеличилась в среднем до 352,02 мкм². После 14 дней охлаждения эпителий трахеи был изменён ещё больше. Кайма эпителия неровная, клетки мелкие. Видны намечающиеся дефекты клеточного ряда в виде слущивания клеток, но без оголения базальной мембраны. Высота пласта

уменьшена в среднем до 14,58 мкм (рис. 2). Площадь реснитчатых клеток в среднем составила 96,68 мкм². После 21-дневного охлаждения эпителиальный пласт уже резко отличался от интактной ткани. Клеточный ряд гипертрофированных эпителиоцитов потерял свою целостность. Волнообразная деформация поверхности эпителия усугубилась разрывами пласта со слущиванием клеток и отрывом от подлежащих структур, средняя высота эпителия составляла 19,68 мкм (рис. 3). Площадь реснитчатых клеток в среднем составила 145,80 мкм². Измеренные величины сведены в таблицу (табл.).

Таблица

Планиметрические показатели эпителия слизистой оболочки трахеи крыс в исследуемых группах (M±m)

Группы животных	Высота эпителия, мкм	Площадь эпителиоцитов, мкм ²	Округлость (2S/P) эпителиоцитов, мкм
Интактные	29,72±0,62	238,46±0,74	5,12±0,40
Воздействие холодом в течение 7 дней	19,99±0,47**	352,02±11,92**	7,62±0,34*
Воздействие холодом в течение 14 дней	14,58±0,29**	96,68±5,60**	3,84±0,19*
Воздействие холодом в течение 21 дня	19,68±0,59**	145,80±6,48**	5,34±0,20

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ – уровень статистической значимости различий показателей по сравнению с группой интактных животных. Различия между измеренными показателями рассчитаны непарным критерием Стьюдента.

Сравнение коэффициентов вариации измеренных величин в данных из экспериментальных групп выявило наибольшую однородность показателя площади эпителиоцитов в группе 7-дневного охлаждения (11%), а наименьшую однородность – в группе 14-дневного охлаждения (18%). По величине высоты эпителия и площади реснитчатых клеток непарный критерий Стьюдента продемонстрировал стопроцентное различие экспериментальных групп от интактной. Однофакторный дисперсионный анализ показал, что фактор охлаждения с вероятностью 99% статистической значимости влияет на показатели высоты, площади и округлости реснитчатых клеток эпителия.

Обсуждение полученных результатов

Исследование материала от интактных животных показало, что в отсутствие экспериментальных воздействий эпителиальный пласт слизистой оболочки трахеи лабораторных животных был обычного плана строения [6]. После экспериментального охлаждения организма наблюдались закономерные признаки дезорганизации эпителиальной ткани [8]. При этом наблюдался ряд изменений морфологического строения всего эпителиального пласта [9], это сложилось в ряд определённых явлений: нарушение непрерывности клеточного ряда; неровность каймы эпителия. Помимо этого, изменения коснулись и самих эпителиоцитов: деструкция апикального полюса клеток, трансформация призматического контура клеток в более округлый, наряду с численными изменениями высоты и площади эпителиоцитов.

При 7-дневном охлаждении высота эпителия была снижена на 33%, площадь и округлость реснитчатых клеток были повышены относительно интактной группы на 48 и 49%, соответственно. При 14-дневном охлаждении высота эпителия была пониженной уже на 51%, площадь реснитчатых клеток снизилась на 59% относительно интактных крыс, а округлость уменьшилась на 25%. Трёхнедельное охлаждение вызвало снижение высоты эпителия на 34%, что практически сопоставимо с изменениями после недельной длительности. Площадь реснитчатых клеток была меньше контрольной на 39%. Округлость превышала контрольную лишь на 4%. Видно, что по мере продолжительности охлаждения высота эпителия уменьшается, видимо за счёт гипотермического угнетения интенсивности метаболизма [12]. Незначительный прирост высоты эпителия, наблюдавшийся при 21-дневном охлаждении, вполне вероятно обусловлен продолжающейся продольной деформацией клеток и увеличением межклеточных пространств из-за усугубляющейся тканевой дезорганизации. Так, например, в группе 7-дневного охлаждения изменение формы клеток с вытянутой на более округлую объективизировалось увеличением округлости (отношения удвоенной площади к периметру) эпителиоцитов на 49%. После 2-недельного охлаждения показатель округлости, наоборот, снизился на 25% по отношению к интактной группе. На 3-недельном сроке охлаждения округлость превысила контрольные значения всего на 4%. Значения этих показателей положительно коррелировали с уменьшением высоты эпителия при охлаждении. Видно, что

увеличение срока воздействия холода вызывает интенсификацию обмена, сменяющуюся угнетением, за счёт истощения компенсаторного ресурса. Представляется, что компенсация воздействия холода реализуется гипертрофией эпителиоцитов с изменением линейных размеров. Это косвенно нашло своё отражение в увеличении площади по сравнению с контролем. При этом высота и площадь эпителиоцитов с признаками тенденции к уменьшению всё же мало чем различается с контрольными показателями.

Таким образом, выполненное исследование продемонстрировало, как низкое температурное воздействие закономерно отражается на морфофункциональном состоянии органов дыхания. Компенсаторно-приспособительной перестройке в первую очередь подвержена пограничная структура воздухоносных путей – эпителий слизистой оболочки [7]. Реакция эпителия трахеи на температурные воздействия находит ожидаемое отражение в изменениях морфометрических параметров [3], и поначалу выражается увеличением площади и округлости реснитчатых клеток, наряду с понижением высоты. Морфологические изменения эпителия выражены тенденцией к приспособительной гипертрофии. По мере увеличения длительности экспериментального воздействия реактивные изменения усугубляются. Так, после двух недель охлаждения истощается компенсаторный ресурс и развивается состояние угнетения метаболизма, при котором высота, площадь и округлость реснитчатых клеток эпителия слизистой оболочки трахеи уменьшаются. Дальнейшее продолжение охлаждения сопровождается небольшим ростом высоты эпителия, но этот рост, по-видимому, является следствием продолжающейся деформации клеток. При этом, несмотря на сохранение многоярусного плана строения и начинающееся было приспособительное увеличение слизиобразования, полноценной компенсации уже не происходит.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №12-04-91162).

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Адо А.Д. Проблемы реактивности в современной общей патологии // Вестн. АМН СССР. 1979. №11. С.57–64.
3. Дискриминантный анализ бронхоальвеолярной цитограммы больных бронхиальной астмой / С.В.Зиновьев [и др.] // VII Национальный конгресс по болезням органов дыхания: сб. трудов. М., 1997. с. 406.
4. Колосов В.П., Перельман Ю.М., Гельцер Б.И. Реактивность дыхательных путей при хронической обструктивной болезни легких. Владивосток: Дальнаука, 2006. 184 с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. 293 с.
6. Морозова Е.В., Ерофеева Л.М., Коплик Е.В. Морфология и цитоархитектоника лимфоидных образований в стенках трахеи у крыс с различной

восприимчивостью к эмоциональному стрессу // Вестн. нов. мед. технол. 2007. Т.10, №1. С.29–32.

7. Адаптация эпителия трахеи в широком диапазоне температур (экспериментальное исследование) / А.В.Прокопенко [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2013. Вып.48. С.63–69.

8. Скляр В.Е. Возрастные изменения слизистой оболочки полости рта и их влияние на клиническое течение хронического рецидивирующего афтозного стоматита: дис. ... канд. мед. наук. Одесса, 1968. 274 с.

9. Целуйко С.С., Прокопенко А.В. Системный анализ компенсаторно-приспособительных реакций в лёгких. Благовещенск: АГМА, 2001. 124 с.

10. Шмальгаузен И.И. Основы сравнительной анатомии позвоночных животных. М.: Сов. наука, 1947. 541 с.

11. Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism / M.Li [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. 2011. Vol.128, №3. P.626–634.

12. Wang L.C.H., Lee T.F. Torpor and hibernation in mammals: metabolic, physiological and biochemical adaptations // Handbook of Physiology / eds. M.J.Fregly, C.M.Blattis. 1996. №4. P.507–531.

REFERENCES

1. Avtandilov G.G. *Meditinskaya morfometriya* [Medical morphometry]. Moscow: Meditsina; 1990.
2. Ado A.D. *Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR* 1979; 11:57–64.
3. Zinov'yev S.V., Tseluyko S.S., Krasavina N.P., Prokopenko A.V., Zabora S.M. *VII Natsional'nyy kongress po boleznyam organov dykhaniya* (VII National Congress on Respiratory Diseases). Moscow; 1997:406.
4. Kolosov V.P., Perelman J.M., Gel'tser B.I. *Reaktivnost' dykhatel'nykh putey pri khronicheskoy obstruktivnoy bolezni legkikh* [Airway reactivity in chronic obstructive pulmonary disease]. Vladivostok: Dal'nauka; 2006.
5. Lakin G.F. *Biometriya* [Biometry]. Moscow: Vysshaya shkola; 1980.
6. Morozova E.V., Erofeeva L.M., Koplik E.V. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy* 2007; 10(1):29–32.
7. Prokopenko A.V., Tseluyko S.S., Dolgoplov A.S., Zhou X.D., Li Q. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2013; 48:63–69.
8. Sklyar V.E. *Vozrastnye izmeneniya slizistoy obolochki polosti rta i ikh vliyaniye na klinicheskoye techeniye khronicheskogo retsidiviruyushchego aftoznogo stomatita: dissertatsiya kandidata meditsinskikh nauk* [Age-related changes in the mucous membranes of the oral cavity and their impact on the clinical course of chronic recurrent aphthous stomatitis: thesis...candidate of medical sciences]. Odessa; 1968.
9. Tseluyko S.S., Prokopenko A.V. *Sistemnyy analiz kompensatorno-prisposobitel'nykh reaktsiy v legkikh* [System analysis of the compensatory-adaptive reactions in the lung]. Blagoveshchensk: AGMA; 2001.
10. Shmal'gauzen I.I. *Osnovy sravnitel'noy anatomii*

pozvonochnykh zhivotnykh [Fundamentals of the comparative anatomy of vertebrates]. Moscow: Sovetskaya nauka; 1947.

11. Li M., Li Q., Yang G., Kolosov V.P., Perelman J.M., Zhou X.D. Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8

(TRPM8)-mediated mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 128(3):626–634.

12. Wang L.C.H., Lee T.F. Torpor and hibernation in mammals: metabolic, physiological and biochemical adaptations. In: Fregly M.J., Blatteis C.M., editors. *Handbook of Physiology*. 1996: 507–531.

Поступила 24.10.2013

Контактная информация

Алексей Владимирович Прокопенко

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории,

Амурская государственная медицинская академия,

675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95.

E-mail: avppost@ya.ru

Correspondence should be addressed to

Aleksey V. Prokopenko,

MD, PhD, Senior staff scientist of Central Research Laboratory,

Amur State Medical Academy,

95 Gor'kogo Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: avppost@ya.ru