

УДК 611-001.18(611.231-018.7:612.017.2)

СТЕРЕОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ТРАХЕИ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ ОРГАНИЗМА

А.В.Прокопенко¹, С.С.Целуйко¹, А.С.Долгополов¹, С.Д.Чжоу², Ц.Ли²¹Амурская 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, морфометрическая и стереологическая характеристика тканевых компонентов 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 и стереологические 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. Объёмная плотность эпителия уменьшилась на 24%, поверхностная плотность – на 12%, но численная плотность увеличилась на 60%. При 14-дневном охлаждении высота эпителия уменьшалась на 51%, площадь реснитчатых клеток снизилась на 59%, а округлость уменьшилась на 25%. Объёмная плотность эпителия уменьшилась на 22%, поверхностная плотность – на 24%, численная плотность увеличилась на 26%. Трёхнедельное охлаждение вызвало уменьшение высоты эпителия на 34%. Площадь реснитчатых клеток была меньше контрольных значений на 39%. Округлость превышала показатели в контроле лишь на 4%. Объёмная плотность эпителия уменьшилась на 34%; поверхностная плотность – на 37%; численная плотность увеличилась на 13%. Среди измеренных стереологических параметров адаптирующегося эпителия наиболее объективным является лишь показатель поверхностной плотности, так как изменяется в линейной зависимости от срока холодного воздействия.

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

SUMMARY

TRACHEAL EPITHELIUM STEREOLOGICAL PARAMETERS IN BODY COOLING

A.V.Prokopenko¹, S.S.Tseluyko¹, A.S.Dolgoplov¹, X.D.Zhou², Q.Li²¹Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str.,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation²The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, 76 Linjiang Road, Chongqing, 400010, China

Morphological, morphometric and stereological characteristics of ciliated epithelial cells of the tracheal mucosa in albino rats during cooling of the body was studied. Three groups of laboratory animals were cooled for 3 hours a day at -15°C during 7, 14 and 21 days. After the experiment the stains from paraffin sections were made. With light microscopy planimetric and stereological quantities in the epithelial layer from the experimental and intact animals were measured. The measured values in the experimental groups were compared with the intact group. It was found out that at 7-day cooling epithelial height decreased by 33%; the size and roundness of ciliated cells increased against intact group by 48% and 49%, respectively. The volume density of epithelium decreased by 24%, the surface density by 12%, but the length density increased by 60%. At 14-day cooling the height was reduced by 51%, the area of ciliated cells decreased by 59%, and the roundness decreased by 25%. The volume density of epithelium decreased by 22%, the surface density by 24%; and the length density increased by 26%. Three-week cooling caused the 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%. The volume density of the epithelium decreased by 34%, the surface density by 37%; and length density increased by 13%. Among measured stereological parameters only the surface density was the most objective parameter of adapting epithelium as it has had the linear depending on the longitude of cold exposure.

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

Морфологическая практика давно использует количественные методы исследований [1]. Особенный успех при этом достигнут отечественными исследователями при оценке ультраструктуры миокарда, как в норме, так и в патологии [4]. Опираясь на такой положительный опыт, в настоящей работе было решено изучить стереологические показатели эпителия трахеи, так как ранее выявленные изменения компонентов в эпителии при холодных воздействиях на организм носили количественный характер [5]. Выявленные тогда изменения размера и формы эпителиоцитов носили характер, прогрессивно зависящий от времени холодного воздействия на организм. Но изменения размера эпителиоцитов приобретали противоположный характер в экспериментальных группах, где охлаждение пре-

вышло недельный срок [6]. Такая нелинейная зависимость от времени вызывает интерес и, соответственно, требует дальнейшего изучения. Поскольку стереологический анализ способен выявить функционально обусловленные сдвиги структурного равновесия [8], в представляемом исследовании было задумано найти такие компоненты в эпителии слизистой оболочки трахеи, стереометрическая оценка которых послужила бы для выявления структур, морфологически обеспечивающих процессы 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, выведения животных из опыта проходил с учётом требований к принципам биологической этики, изложенных в международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием 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 №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики. Исследование одобрено этическим комитетом Амурской государственной медицинской академии.

Было сформировано 4 группы исследуемых животных. В каждую группу взято по 3 особи половозрелых самцов для исключения какого-либо нежелательного влияния эстрального цикла на ход эксперимента. Первая группа (интактные животные) выступала в роли контрольной. Остальные группы 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). 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 определяли как планиметрические (линейные, площадные), так и стереологические характеристики эпителиальных клеток. Помимо высоты эпителия, площади клеток, измерялась объёмная плотность эпителия и отдельных клеток. Результаты пред-

ставлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка среднего арифметического значения. После морфометрии в программе Statistica 6.0 проверялась нормальность выборок оцениванием 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 проводились дисперсионным анализом (ANOVA). Статистическая взаимосвязь измеренных величин определялась корреляционным анализом. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [3].

Результаты исследования

При микроскопическом исследовании было определено, что в полученном материале сам общий план структурной организации слизистой оболочки крыс сохранялся, но воздействие экспериментальных факторов оставило свои определённые следы. Интересующие изменения эпителиального слоя, выстилающего внутреннюю поверхность трахеи, выразились в изменении размера, формы эпителиальных клеток и показателей пространственного расположения клеток (математически восстановленных из планиметрических данных).

В группе интактных животных средняя высота эпителия составила в среднем $29,72 \text{ мкм}$, высота ресничек при этом в среднем была $4,5 \text{ мкм}$, площадь реснитчатых клеток – $238,46 \text{ мкм}^2$. Измерения стереологических параметров показали, что объёмная плотность эпителия составила $79,77\%$, поверхностная плотность – $0,92 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$, численная плотность – $28,32 \text{ куб. мкм}^{-1}$.

В материале из экспериментальных групп наряду с явными морфологическими изменениями эпителия слизистой оболочки трахеи наблюдались и нарушения планиметрических и стереологических показателей. У животных после 7-дневного охлаждения эпителиальный пласт отличался своей уменьшённой высотой до $19,99 \text{ мкм}$ в среднем. Кайма имела умеренную волнообразность с периодом около 20 мкм . Клетки изменили форму на более округлую (рис. 1). Площадь реснитчатых клеток увеличилась в среднем до $352,02 \text{ мкм}^2$. Измерения стереологических параметров показали, что по сравнению с интактной группой объёмная плотность эпителия уменьшилась до $60,88\%$, поверхностная плотность уменьшилась до $0,81 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$, численная плотность увеличилась до $45,31 \text{ куб. мкм}^{-1}$.

После 14 дней охлаждения изменения эпителия стали ещё больше выраженными. Край эпителия неровный, клетки мелкие. Видны дефекты клеточного ряда в виде слущивания клеток, но не достигающие базальной мембраны. Высота пласта уменьшена в среднем до $14,58 \text{ мкм}$ (рис. 2). Площадь реснитчатых клеток снизилась в среднем до $96,68 \text{ мкм}^2$. Измерения стереологических параметров показали, что в сравнении с интактной группой объёмная плотность эпителия также уменьшилась до $62,67\%$, поверхностная плот-

ность – до 0,7 мкм²/мкм³, численная плотность – до 35,62 куб.мкм⁻¹.

После 21-дневного охлаждения вид эпителиального слоя уже резко отличался от интактной ткани. Клеточный ряд гипертрофированных эпителиоцитов потерял свою целостность. Волнообразная деформация поверхности эпителия усугубилась разрывами пласта со сдвиганием клеток и отрывом от подлежащих структур, средняя высота эпителия составляла 19,68 мкм (рис.

3). Площадь реснитчатых клеток в среднем составила 145,80 мкм². Измерения стереологических параметров показали, что объёмная плотность эпителия уменьшилась до 45,7%, поверхностная плотность ещё больше снизилась до 0,61 мкм²/мкм³, численная плотность ещё более снизилась до 31,92 куб.мкм⁻¹.

Измеренные величины сведены в таблицы (табл. 1, 2).

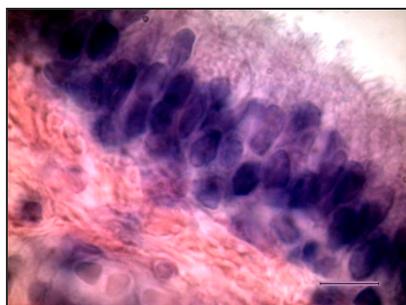


Рис. 1. Эпителий слизистой оболочки трахеи на поперечном срезе. 7-дневное охлаждение. Объектив 100×. Гематоксилин-эозин. Мерный отрезок 10 мкм.

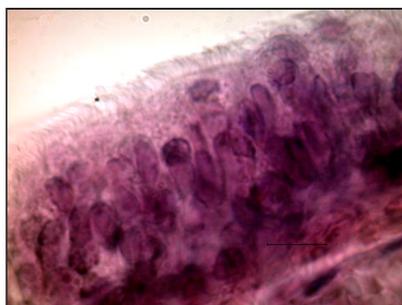


Рис. 2. Эпителий слизистой оболочки трахеи на поперечном срезе. 14-дневное охлаждение. Объектив 100×. Гематоксилин-эозин. Мерный отрезок 10 мкм.



Рис. 3. Эпителий слизистой оболочки трахеи на поперечном срезе. 21-дневное охлаждение. Объектив 100×. Гематоксилин-эозин. Мерный отрезок 10 мкм.

Таблица 1

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 (7 дней)	19,99±0,47	352,02±11,92	7,62±0,34
Воздействие холодом (14 дней)	14,58±0,29	96,68±5,60	3,84±0,19
Воздействие холодом (21 день)	19,68±0,59	145,80±6,48	5,34±20

Таблица 2

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

Группы животных	Объёмная плотность, %	Поверхностная плотность, мкм ² /мкм ³	Численная плотность, куб. мкм ⁻¹
Интактные	79,77±0,27	0,92±0,11	28,32±0,52
Воздействие холодом (7 дней)	60,88±1,40	0,81±0,20	45,31±3,43
Воздействие холодом (14 дней)	62,67±3,62	0,70±0,09	35,62±1,72
Воздействие холодом (21 день)	45,70±0,59	0,61±0,08	31,92±1,17

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

Величины всех измеренных стереологических по-

казателей в экспериментальных группах стопроцентное различие с показателями в интактной группе.

Изменение объёмной плотности эпителия по мере увеличения срока воздействия холода происходило, в целом, с тенденцией к уменьшению. Хотя при этом наблюдалось не дальнейшее снижение, а незначительное повышение уровня данного показателя после 14 дней охлаждения. Однако при его сравнении критерием Стьюдента с величиной объёмной плотности эпителия после 7 дней охлаждения не было выявлено статистически значимой разницы. Статистически значимые различия с контрольной величиной интактной группы возникли только на сроке 21 дня охлаждения.

Величина поверхностной плотности прогрессивно

снижалась по мере увеличения срока охлаждения, но статистически значимая разница с контрольной величиной в интактной группе также возникла только на сроке 21 дня охлаждения.

Показатель численной плотности, в отличие от других стереологических параметров, варьировал без какой-либо тенденции, связанной с длительностью охлаждения. Но, в отличие от других показателей, на каждом этапе экспериментального воздействия эти величины имели статистически значимую разницу с контрольной группой.

Обсуждение результатов исследования

Если в материале от интактных животных слизистая оболочка трахеи была обычного плана строения [10], то после охлаждения наблюдалась дезорганизация эпителиальной ткани. Выявленные морфологические изменения эпителиального пласта [9] сложились в определённую картину: неровность каймы эпителия с прерывистостью клеточного ряда. Наряду с нарушениями тканевой организации, отмечены изменения самих эпителиоцитов. Это деструкция апикального полюса клеток, деформация призматического контура с тенденцией в округление, численными изменениями высоты и площади эпителиоцитов, наряду с модификациями стереологических параметров.

После 7 дней охлаждения высота эпителия снизилась на треть (33%). Площадь и округлость реснитчатых клеток, наоборот, наполовину увеличились (48% и 49%, соответственно). Объёмная плотность эпителия уменьшилась на 24%, поверхностная плотность – на 12%, но численная плотность увеличилась более чем наполовину – на 60%. При 14-дневном охлаждении высота эпителия была пониженной уже на 51%, площадь реснитчатых клеток снизилась на 59% относительно группы интактных животных, а округлость уменьшилась на 25%. Объёмная плотность эпителия уменьшилась на 22%, поверхностная плотность – на 24%, численная плотность увеличилась на 26%. Трёхнедельное охлаждение снизило эпителий лишь на 34%, что сопоставимо с изменениями после недели охлаждения. Площадь реснитчатых клеток была меньше контрольной на 39%. Округлость превышала контрольную всего на 4%. Объёмная плотность эпителия уменьшилась на 34%; поверхностная плотность – на 37%, численная плотность увеличилась на 13%. Видно, что по мере продолжительности охлаждения высота эпителия уменьшается, вероятно за счёт гипотермического угнетения интенсивности метаболизма [11]. Незначительный прирост эпителия после 21 дня охлаждения, по-видимому, обусловлен продолжающейся продольной деформацией клеток и увеличением межклеточных пространств из-за усугубляющейся тканевой дезорганизации. Так, например, изменение формы клеток с вытянутой на более округлую в группе 7-дневного охлаждения, объективизировалось увеличением округлости (отношения удвоенной площади к периметру) эпителиоцитов на 49%. После двухнедельного охлаждения показатель округлости, наоборот, снизился на 25% по отношению к интактной группе. На 3-не-

дельном 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 на организм экспериментальных животных 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 различаются с контрольными показателями. Изучение стереологических параметров эпителия показало, что, по крайней мере, один из трёх показателей (поверхностная плотность) безоговорочно прогрессивно уменьшается по мере увеличения срока охлаждения. А самым нелинейно изменчивым параметром с доказанной статистической значимостью ($p < 0,05$) оказалась численная плотность.

Таким образом, исследование демонстрирует, какие морфометрические показатели объективно и статистически значимо отражают низкотемпературное воздействие на морфофункциональное состояние органов дыхания [2]. Компенсаторно-приспособительной перестройке в первую очередь подвержена пограничная структура воздухоносных путей – эпителий слизистой оболочки. Реакция эпителия трахеи на температурные воздействия находит ожидаемое отражение в изменениях морфометрических параметров [7], 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 двухнедельного охлаждения истощается компенсаторный ресурс и развивается угнетение метаболизма, при котором высота, площадь и округлость реснитчатых клеток эпителия слизистой оболочки трахеи уменьшаются, наряду с объёмной и поверхностной плотностью. Продолжение охлаждения вызывает небольшой прирост высоты эпителия, но это, по-видимому, лишь следствие продолжающейся клеточной деформации, а эффективная компенсация уже невозможна. Наиболее объективным параметром выступает лишь стереологический показатель «поверхностная площадь», так как он изменяется в линейной зависимости от срока холодового воздействия. Выявленный нелинейный характер изменения стереологического параметра «численная плотность» тоже заслуживает своего дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г., Яблунчанский Н.И., Губенко В.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса. М.: Медицина, 1981. 192 с.
2. Адо А.Д. Проблемы реактивности в современной общей патологии // Вестник АМН СССР. 1979. №11.

C.57–64.

3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. 293 с.

4. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Непомнящих Г.И. Морфометрия и стереология гипертрофии миокарда. Новосибирск: Наука, 1986. 304 с.

5. 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.

6. Планиметрические изменения эпителия трахеи при охлаждении организма / А.В.Прокопенко [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2013. Вып.50. С.51–55.

7. Диагностическая ценность цитометрии бронхоальвеолярной лаважной жидкости больных бронхиальной астмой / А.В.Прокопенко [и др.] // 7 Национальный конгресс по болезням органов дыхания, сборник резюме. М., 1997. С.199.

8. Христоролюбова Н.Б., Шилов А.Г. Возможности применения стереологического анализа в изучении структурной организации клеток и тканей // Применение стереологических методов в цитологии / под ред. А.Д.Груздева. Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики, 1974. С.54–62.

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. 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.Blatteis. 1996. №4. P.507–531.

REFERENCES

1. Avtandilov G.G., Yabluchanskiy N.I, Gubenko V.G. *Systemnaya stereometriya v izuchenii patologicheskogo protsessa* [System stereometry in pathology process investigation]. Moscow: Meditsina; 1981.

2. Ado A.D. *Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR* 1979; 11:57–64.

3. Lakin G.F. *Biometriya* [Biometry]. Moscow: Vysshaya shkola; 1980.

4. Nepomnyashchikh L.M., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh G.I. *Morfometriya i stereologiya gipertrofii miokarda* [Morphometry and stereology of myocard hypertrophy]. Novosibirsk: Nauka; 1986.

5. Prokopenko A.V., Tseluyko S.S., Dolgopolov A.S., X.D., Li Q. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2013; 48:63–69.

6. Prokopenko A.V., Tseluyko S.S., Dolgopolov A.S., Zhou X.D., Li Q., Mishuk V.P., Landyshev S.Yu. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2013; 50:51–55.

7. Prokopenko A.V., Tseluyko S.S., Krasavina N.P., Zinov'ev S.V. *Materialy 7 Natsional'nogo kongressa po boleznyam organov dykhaniya* (The materials of 7th National Congress on Respiratory Diseases). Moscow; 1997: S.199.

8. Khristolyubova N.B, Shilov A.G. *Vozmozhnosti primeneniya stereologicheskogo analiza v izuchenii strukturnoy organizatsii kletok i tkaney. V knige: Gruzdev A.D. (red.). Primenenie stereologicheskikh metodov v tsitologii* [The possibility of using stereological analysis in the study of the structural organization of cells and tissues. In: Gruzdev A.D., editor. The application of stereological methods in cytology]. Novosibirsk; 1974:54–62.

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: АГМА; 2001.

10. Shmal'gauzen I.I. *Osnovy sravnitel'noy anatomii pozvonochnykh zhivotnykh* [Fundamentals of the comparative anatomy of vertebrates]. Moscow: Sovetskaya nauka; 1947.

11. 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 21.02.2014

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