

УДК 616.24-001.19:611-018.7]616-092.9

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗЕОБРАЗУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ ВОЗДУХОНОСНОГО ОТДЕЛА ЛЕГКИХ КРЫС ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

С.С.Целуйко¹, Д.А.Семенов^{1,2}, Ю.М.Перельман², А.Н.Одирев²

¹Амурская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, 675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95

²Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ

Изучалась морфологическая и морфометрическая характеристика клеток эпителия слизистой оболочки трахеи лабораторных животных, подвергавшихся экспериментальному осмотическому воздействию. Измерена высота эпителиального пласта у интактных крыс и при воздействии вдыхаемого воздуха 100% влажности. Проведены качественные гистологические и электронно-микроскопические исследования компенсаторно-приспособительных реакций эпителиоцитов слизистой оболочки трахеи крыс. Установлено, что при ультразвуковой ингаляции дистиллированной воды эпителиальные клетки (реснитчатые и бокаловидные) эпителиального пласта расширяются, что приводит к увеличению высоты эпителия и возникновению отека в подслизистой основе. Происходит расширение межклеточных пространств эпителиального пласта слизистой оболочки трахеи. В последующем в межклеточные пространства проникают тучные клетки – это способствует развитию воспаления дыхательных путей.

Ключевые слова: эпителий слизистой оболочки трахеи, адаптация дыхательной системы, вдыхание влажного воздуха, осмотический стресс.

SUMMARY

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF MUCUS-PRODUCING COMPONENTS IN RATS AIRWAYS UNDER OSMOTIC STRESS

S.S.Tseluyko¹, D.A.Semenov^{1,2}, J.M.Perelman², A.N.Odireev²

¹Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

²Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, Russian Federation

Morphological and morphometric characteristics of epithelial cells of the mucous membrane of the trachea in laboratory animals exposed to experimental osmotic stress were studied. The height of the epithelial layer of intact rats under the influence of inhaled air of 100% humidity was measured. The qualitative histological and electronic microscopic studies of compensatory-adaptive reactions of epithelial cells of the mucous membrane of the trachea of rats were done. It was found out that under distilled water ultrasonic inhalation epithelial cells (ciliated and goblet) of the epithelial

layer expand, which results in the increase of epithelial height and the occurrence of edema in the submucosa. There is an expansion of intercellular space of the epithelial layer of the mucous membrane of the trachea. Subsequently, mast cells penetrate into the intercellular space; it promotes the inflammation of airways.

Key words: mucosal epithelium of the trachea, adaptation of the respiratory system, inhalation of humid air, osmotic stress.

Несмотря на достаточную изученность слизистой оболочки воздухоносных путей млекопитающих, представления о её гистологической и ультрамикроскопической организации продолжают расширяться. Это становится возможным не только за счёт развития исследовательской методологии, но и из-за модифицирования условий эксперимента. Жизнь организма подразумевает возможность адаптироваться к климатическим факторам его географического ареала в необходимом и достаточном для этого диапазоне реакций [5, 6]. Дыхательная система способна функционировать как при повышенной влажности, так и при пониженной на фоне положительных и отрицательных температур окружающей среды. В том и другом случае, механизмы приспособления к колебаниям влажности вдыхаемого воздуха должны иметь некие общие аспекты в плане морфологического обеспечения.

Изменение осмолярности межклеточного пространства является серьезной угрозой гомеостазу отдельной клетки и организма в целом и сопровождается комплексом ответных реакций, именуемых осмотическим стрессом. В норме осмотическое давление поддерживается в пределах 270-300 мОсм/кг, сдвиги в меньшую или в большую сторону вызывают соответствующие изменения объема клетки. Это приводит к сморщиванию или растяжению клетки, нарушению структуры ее цитоскелета и изменению конформации мембранных белков.

Туман дистиллированной воды, полученной с помощью мощного ультразвукового ингалятора, был использован для оценки гиперреактивности бронхов у астматиков. У десяти здоровых субъектов ультразвуковой туман H₂O не вызывал каких-либо функциональных изменений, в то время как у тринадцати больных бронхиальной астмой приводил к выраженному бронхоспазму. Реакция на ингаляцию дистиллированной воды у больных бронхиальной астмой сопряжена с повышенным количеством эозинофилов и тучных клеток в бронхиальных биоптатах и увеличением экспрессии эндотелина-1 бронхиальным эпителием [9]. В морфо-

метрической оценке слизистой оболочки дыхательных путей после ультразвукового распыления дистиллированной водой и озоном с одинаковой скоростью потока (5 л/мин) в течение 2 часов наблюдалось значительное набухание эпителиальных клеток в эксперименте. Сопротивление легких значительно увеличилось после 10-мин. ингаляции влажного воздуха. Эти изменения уменьшались при предварительной ингаляции индометацина [8]. Важнейшим звеном в патогенезе осмотических реакций считаются тучные клетки. Было обнаружено, что под воздействием гипертонической стимуляции тучные клетки способны высвобождать такие воспалительные медиаторы, как простагландин D₂, по-видимому, играющий центральную роль в воспалительном ответе, лейкотриен C₄ и тромбоксан B₂ [4]. Еще одним аспектом осмотического воздействия является осмотическая регуляция секреции муцинов. Установлено, что наряду с гиперосмотической средой, низкое осмотическое давление также способно индуцировать экспрессию и секрецию MUC5AC, что сопровождается уменьшением экспрессии гена аквапорина AQP-5 у больных ХОБЛ [4, 7].

Таким образом, воздействие осмотических стимулов на клетку вызывает широкий спектр реакций, включая воспалительный ответ. При этом лишь малая их часть изучена в аспекте осмотической реакции дыхательных путей, а исследования клеточных и молекулярных механизмов осмотической гиперреактивности у больных бронхиальной астмой единичны и не раскрывают проблему сколько-нибудь значимым образом.

В представляемом исследовании были изучены морфологические изменения в эпителии слизистой оболочки трахеи при адаптации воздухоносных путей

к высокому (100%) содержанию влаги во вдыхаемом воздухе. Решение задач, положенных в основу настоящего исследования, будет способствовать лучшему пониманию патогенетических особенностей реакции респираторного тракта больных бронхиальной астмой на осмотический стимул, что поможет в разработке новых фармакологических способов коррекции осмотической гиперреактивности, реализуя персонализированный подход в терапии заболевания.

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнялся на беспородных белых крысах (*Rattus norvegicus*) отряда Rodencia. Исследование проведено на 30 белых беспородных половозрелых крысах-самцах с массой тела 150-200 г.

Созданы следующие группы: 1 – интактные животные, 2 – экспериментальное воздействие воздухом с 100% влажностью.

Интактные животные находились в помещении при температуре 25°C и 30% влажности воздуха.

Экспериментальная модель заключалась в воздействии на органы дыхания крыс воздуха 100% влажности при температуре 25°C путем распыления дистиллированной воды ультразвуковым аппаратом по 6 часов ежедневно в течение 7 дней (рис. 1). 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).



Рис. 1. Экспериментальная установка воздействия на органы дыхания крыс воздуха 100%-й влажности путем распыления дистиллированной воды ультразвуковым аппаратом при температуре 25°C по 6 часов ежедневно в течение 7 дней.

Модель экспериментального стопроцентного увлажнения воздуха максимально приближена к естественным условиям и полностью отвечает основным требованиям к экспериментальной модели патологического процесса: воспроизводимость, сходство функциональных и структурных нарушений с аналогичными изменениями в лабораторных условиях. Проводимые морфологические, морфометрические исследования позволяют увидеть изменения в трахее и крупных бронхах, в частности, изменения в многоярдом реснитчатом эпителии, мышечной пластинке и подслизистой основе слизистой оболочки.

Результаты исследования и их обсуждение

Микроскопическое исследование показало, что в

полученном материале структурная организация слизистой оболочки крыс не отличалась от общего плана строения, известного у млекопитающих. Средняя высота эпителия в среднем составила 29,72±2,15 мкм. Высота ресничек в среднем составила 4,5±0,9 мкм.

В ответ на ингаляцию 100% увлажненного воздуха эпителиальный пласт слизистой оболочки трахеи приобрёл своеобразную форму. В группе 7-дневного воздействия он виден цельным и непрерывающимся, но волнообразным с чередой вытянутых и гипертрофированных клеток. Высота эпителия увеличена, в среднем до 35,07±1,8 мкм. На большом увеличении заметно наполнение клеток прозрачным секретом. Высота эпителия выросла местами до 46,84±2,3 мкм (рис. 2, 4).

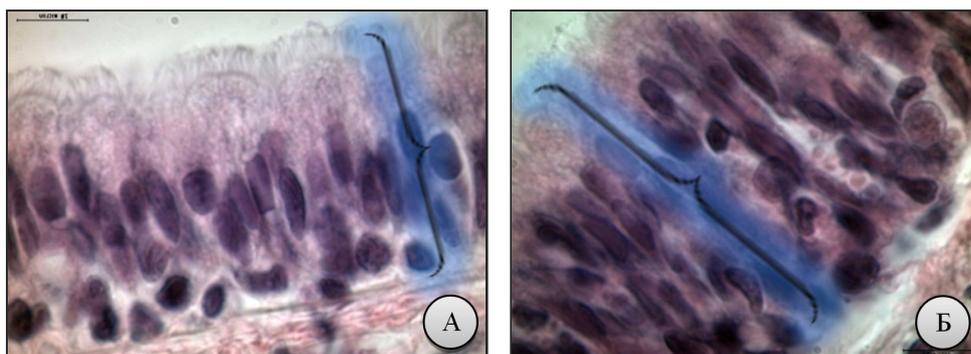


Рис. 2. Интактная группа (А) и группа 7-дневного эксперимента (Б). Увеличение: 1000. Окраска: гематоксилин-эозин.

Видимо, компенсация воздействия влажного воздуха реализуется гипертрофией эпителиоцитов с изменением линейных размеров.

В качестве одного из первичных признаков морфологической перестройки трахеи следует выделить изменения в клеточных элементах, обеспечивающих мукоцилиарный клиренс – реснитчатых и бокаловидных клетках. При длительном вдыхании влажного воздуха на поверхности реснитчатых эпителиоцитов нарушается регулярное расположение ресничек. В одних случаях они образуют скопления 20-30 ресничек в выпячиваниях апикальной поверхности эпителиоцитов, в других – направление ресничек в различные стороны приводит к исчезновению поперечных волн движения ресничек, хорошо различимых у интактных животных. У части реснитчатых клеток выявляются выпячивания апикальной мембраны, в результате образуются «купола», в которых располагаются реснички. Микроворсинки у таких клеток отсутствуют.

Важным морфологическим признаком, отражающим экспериментальное воздействие влажного воздуха, является увеличение клеточных элементов в слизи на поверхности клеток. Характер слизистого секрета бывает различным. В ряде случаев это мелкопористый материал слизи, располагающийся на поверхности клеток. Однако в некоторых случаях этот секрет достигает значительных размеров, образуя сложные полимеризованные структуры мукополисахаридов с большим количеством клеток, представленных эритроцитами, лейкоцитами, макрофагами, слущенным эпителием на различных стадиях деградации (рис. 3).

При длительном вдыхании воздуха 100%-й влажности наблюдаются изменения в апикальном полюсе реснитчатых эпителиоцитов. Часть реснитчатых клеток имеют в апикальном полюсе расширенные каналы эндоплазматического ретикулума (рис. 4). Образующиеся вакуоли сливаются, формируя значительные белковые скопления секрета. Последние деформируют апикальную мембрану, выпячиваются в просвет трахеи с включенными в их состав ресничками (рис. 5). Матрикс митохондрий просветлен и увеличен в объеме. Довольно часто в место расположения таких дегенерирующих клеток проникают мигрирующие сюда тучные клетки с признаками дегрануляции.

Следует подчеркнуть, что межклеточные проме-

жутки между эпителиоцитами расширены (рис. 6). Последние формируют межклеточные каналы, транспортирующие межклеточную жидкость и клеточные элементы подслизистой основы (лейкоциты и тучные клетки) на поверхность трахеи (рис. 7).

Изменения в соединительной ткани подслизистой основы трахеи характеризуются появлением признаков отёка. Расстояние между волокнами возрастает, в этих зонах снижается электронная плотность. Коллагеновые волокна приобретают хаотичное направление, часть их теряет поперечную исчерченность. Возрастает число эластических волокон, расположенных группами, различных по толщине. Особенно многочисленны они около базального слоя эпителия, окружая спазмированные кровеносные капилляры и расширенные венулы, в просвете последних выявляются многочисленные форменные элементы крови (рис. 8А). Эндотелиальные клетки увеличены в размере, содержат многочисленные вакуоли в цитоплазме, нередко образуя выпячивания в просвет (рис. 8Б).

Часть клеток соединительной ткани подвергается дегенеративным изменениям. В ряде случаев выявлены зоны жировой дистрофии, различные по размеру липидосодержащие клетки (поодиночке и в виде скоплений) в соединительной ткани подслизистой основы трахеи. Пучки мышечных волокон имеют различную толщину, разделены довольно широкими прослойками соединительной ткани. Часть гладкомышечных клеток гипертрофированы.

В этих экспериментальных условиях важным морфологическим признаком является усиление активности бокаловидных клеток. Синтез гликопротеидов завершается значительным выбросом их в просвет трахеи. Апикальная поверхность бокаловидных клеток значительно выступает над ресничками, образуя купола, лишённые микроворсинок. Секретция слизи завершается по апокриновому типу с образованием «кратера». Вследствие этого при растровой микроскопии вначале создается впечатление значительного уменьшения количества слизиобразующих клеток. Гиперсекреция – характерный морфологический феномен реакции эпителиального пласта на длительное вдыхание влажного воздуха. При растровом электронно-микроскопическом исследовании отчетливо видно увеличение секреции бокаловидных клеток (рис. 9).

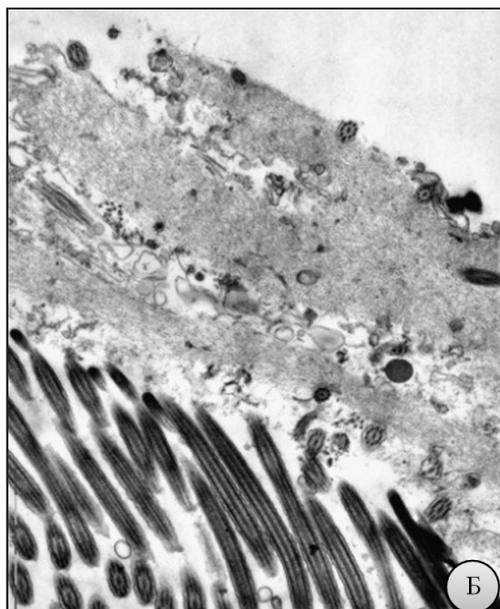
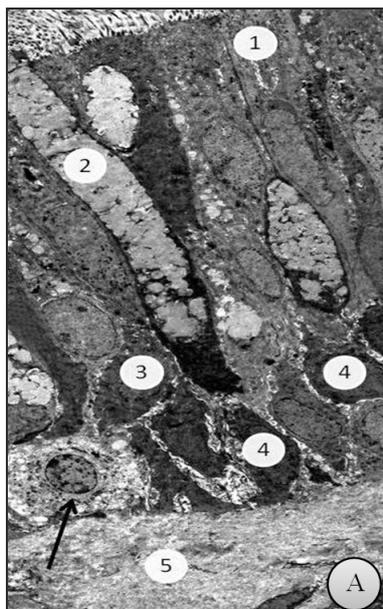


Рис. 3. Многорядный реснитчатый эпителий.

А: 1 – реснитчатые клетки; 2 – бокаловидные клетки; 3 – вставочные клетки; 4 – базальные клетки; 5 – базальная мембрана; стрелка – мигрирующая тучная клетка.

Б – Мелкопористый материал слизи, располагающийся на поверхности клеток. Электронограммы. Увеличение: А – 1000; Б – 30000.

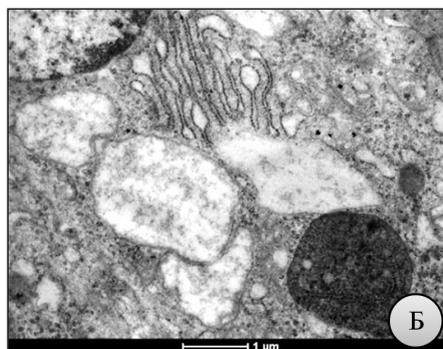
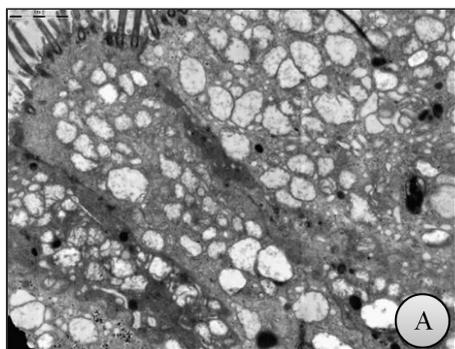


Рис. 4. Реснитчатые клетки имеют в апикальном полюсе расширенные каналы эндоплазматического ретикулума. Электронограммы. Увеличение: А – 5000; Б – 40000.

Б – Мелкопористый материал слизи, располагающийся на поверхности клеток. Электронограммы. Увеличение: А – 1000; Б – 30000.

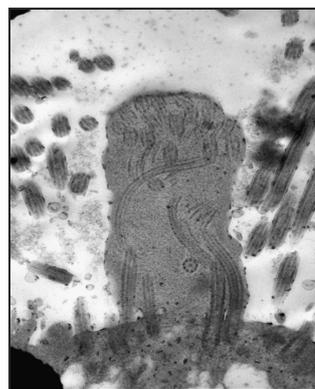
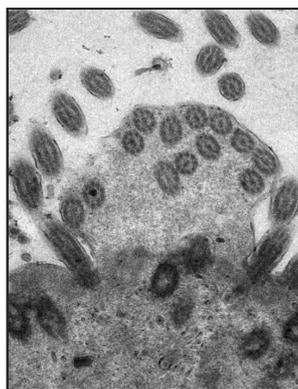
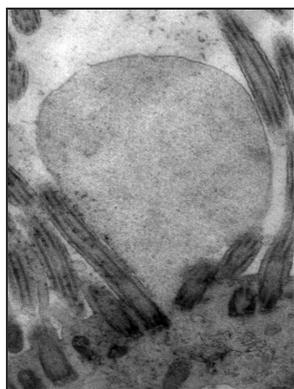


Рис. 5. Скопления секрета деформируют апикальную мембрану, выпячиваются в просвет трахеи с включенными в их состав ресничками. Электронограммы. Увеличение: 40000.

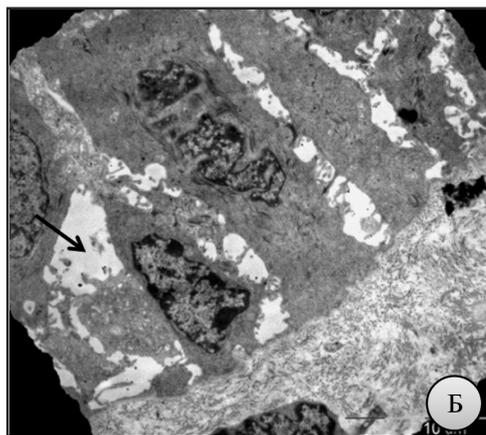
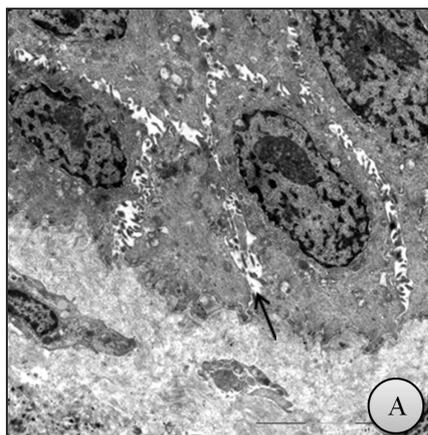


Рис. 6. Межклеточные каналы, транспортирующие межклеточную жидкость. А – интактные крысы. Б – эксперимент (стрелки – межклеточные пространства). Электронограммы. Увеличение: 5000.

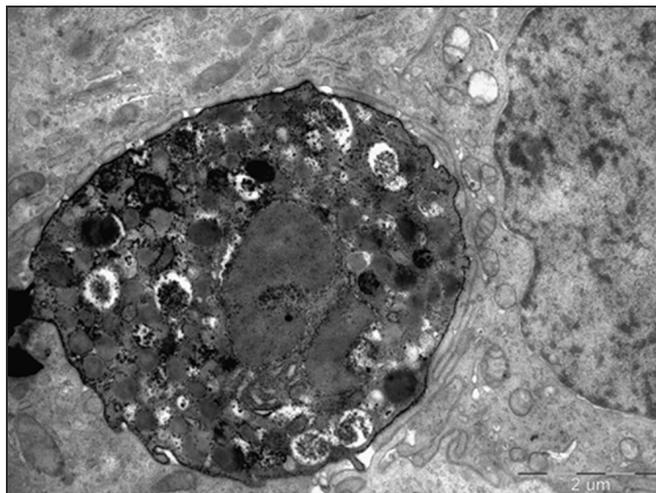


Рис. 7. Тучные клетки проникают на поверхность трахеи через межклеточные пространства из подслизистой основы. Электронограмма. Гистохимическая реакция на кислую фосфатазу. Увеличение: 50000.

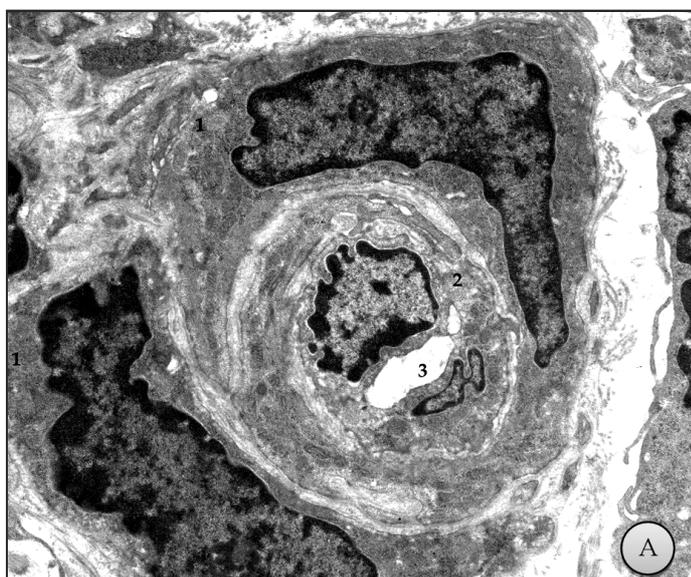


Рис. 8. Собственная пластинка подслизистой основы трахеи.

А. Поперечный срез артериолы (2), диаметр (3) которой значительно уменьшен в связи с сокращением гладкомышечных клеток (1) наружной оболочки сосуда. Заливка: аралдит, эпон. Окраска: уранил ацетат, цитрат свинца. Увеличение: 3000.

Б. Вакуолизация поверхности эндотелиальных клеток капилляров подслизистой подслизистой основы трахеи. Заливка: аралдит, эпон. Окраска: уранил ацетат, цитрат свинца. Увеличение: 30000.

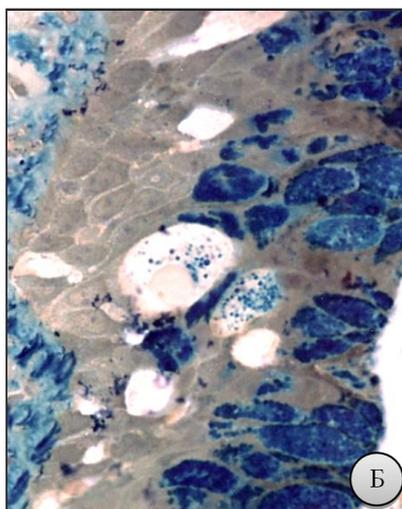
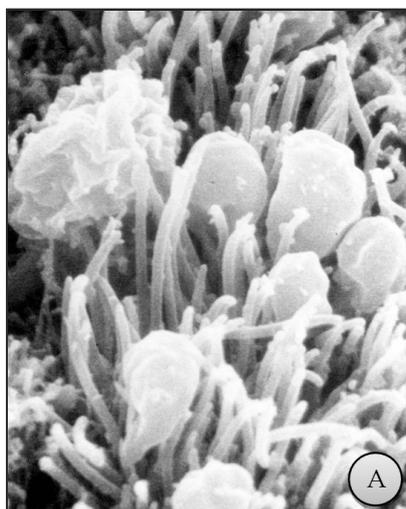


Рис. 9. Увеличение секреции бокаловидных клеток при 7-дневном эксперименте.

А. Растровая электронограмма. Увеличение: 6500.

Б. Гиперсекреция бокаловидных клеток. Полутонкий срез. Увеличение: 1000.

Согласно данным литературы, можно сделать вывод, что воздействие осмотических стимулов на клетку вызывает широкий спектр реакций, включая воспалительный ответ. Реакция на ингаляцию дистиллированной воды у больных бронхиальной астмой сопряжена с повышенным количеством эозинофилов и тучных клеток в бронхиальных биоптатах и увеличением экспрессии эндотелина-1 бронхиальным эпителием. Под воздействием гипертонической стимуляции тучные клетки способны высвобождать простагландин D_2 , лейкотриен C_4 и тромбоксан B_2 [1]. Важным аспектом осмотического воздействия является осмотическая регуляция секреции муцинов. Установлено, что наряду с гиперосмотической средой, низкое осмотическое давление также способно индуцировать экспрессию и секрецию MUC5AC, что сопровождается уменьшением экспрессии гена аквапорина AQP-5 у больных ХОБЛ [7].

Изучение механизмов и последствий осмотического стресса является достаточно сложной, фундаментальной научной проблемой с многочисленными аспектами. При всей важности и масштабе этой проблемы, патогенетические механизмы, опосредующие повышенную осмотическую реактивность дыхательных путей, остаются в значительной части неизученными. Наименее исследованными являются взаимоотношения между молекулярно-генетическими детерминантами данного феномена, оксидативным стрессом и воспалительными каскадами, включающими сложный комплекс клеточных и гуморальных взаимодействий [3]. Особенно остро эта проблема стоит в условиях муссонного климата Дальневосточного региона: здесь неблагоприятное сочетание высокой влажности и низких температур оказывает существенное влияние на резистентность дыхательной системы [2].

Полученные нами данные дают возможность предположить, что ингаляции дистиллированной водой могут привести к чрезмерному сужению дыхательных путей за счет эпителиального отека клеток слизистой оболочки и подслизистой основы трахеи и появления клеток «воспаления» в дыхательных путях крыс в эксперименте. Воздействие влажного воздуха в эксперименте сопровождается характерными изменениями, к числу которых относятся гипертрофия эпителиоцитов с увеличением линейных размеров, изменения в апикальном полюсе реснитчатых эпителиоцитов, увеличение секреции бокаловидных клеток.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №14-25-00019).

ЛИТЕРАТУРА

1. Красавина Н.П., Целуйко С.С., Доровских В.А. Тучные клетки органов дыхания и перспективы их изучения (обзор литературы) // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2004. Вып. 19. С. 74–79.
2. Заболевания органов дыхания в экстремальных экологических условиях Северо-Востока СССР / М.Т.Луценко, С.С.Целуйко, В.П.Самсонов, Л.Г.Мана-

ков, Ю.М.Перельман, А.Б.Пирогов, А.В.Леншин, С.П.Ершов, А.В.Лысенко. Благовещенск, 1990. 177 с.

3. Адаптация эпителия трахеи в широком диапазоне температур (экспериментальное исследование) / А.В.Прокopenко, С.С.Целуйко, А.С.Долгополов, С.Д.Чжоу, Ц.Ли // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2013. Вып. 48. С. 63–69.

4. Гистохимическая характеристика углеводных соединений в воздухоносном отделе легких крыс под действием холодного воздуха / С.С.Целуйко, Н.П.Красавина, Д.А.Семенов, С.Д.Чжоу, Ц.Ли // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2012. Вып. 46. С. 69–76.

5. Новый метод изучения ультраструктурной пространственной организации покровного эпителия слизистой оболочки трахеи / С.С.Целуйко, Д.А.Семенов, М.М.Горбунов, Н.А.Вислобоков, П.Р.Казанский, Н.В.Швындина, В.Я.Шкловер // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2012. Вып. 45. С. 52–56.

6. Hypertonic aerosol inhalation does not alter central airway blood flow in dogs / D.J.Godden [et al.] // J. Appl. Physiol. 1988. Vol. 65, №5. P. 1990–1994.

7. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hyper secretion induced by cold temperatures in cigarette smoke-exposed rats / M.C.Li, G.Yang, X.D.Zhou, S.S.Tseluyko, J.M.Perelman // Int. J. Mol. Med. 2014. Vol. 33, №1. P. 83–90.

8. Effect of ultrasonically nebulized distilled water on airway epithelial cell swelling in guinea pigs / H.Mochizuki [et al.] // J. Appl. Physiol. 1999. Vol. 86, №5. P. 1505–1512.

9. Schoeffel R.E., Anderson S.D., Altounyan R.E. Bronchial hyperreactivity in response to inhalation of ultrasonically nebulised solutions of distilled water and saline // Br. Med. J. 1981. Vol. 283, №6302. P. 1285–1287.

REFERENCES

1. Krasavina N.P., Tseluiko S.S., Dorovskih V.A. Respiration mast cells (literature review). *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2004; 19:74–79 (in russian).
2. Lutsenko M.T., Tseluyko S.S., Samsonov V.P., Manakov L.G., Perelman J.M., Pirogov A.B., Lenchin A.V., Ershov S.P., Lysenko A.V. Respiratory diseases in the extreme ecological conditions of the North and East of the USSR. *Blagoveshchensk*; 1990 (in russian).
3. Prokopenko A.V., Tseluyko S.S., Dolgoplov A.S., Zhou X.D., Li Q. Tracheal epithelium adaptation under the wide range of temperatures (experimental study). *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2013; 48:63–69 (in russian).
4. Tseluyko S.S., Krasavina N.P., Semenov D.A., Zhou X.D., Li Q. Histochemical characteristics of carbohydrate compounds in the airway of rats lungs under exposure to cold *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2012; 46:69–76 (in russian).
5. Tseluyko S.S., Vislobokov N.A., Kazanskiy P.R., Shvyndina N.V., Shklover V.Ya., Semenov D.A., Gorbunov M.M. New method for the study of ultrastructural

spatial organization of tectorial epithelium of the trachea mucosa. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2012; 45:52–56 (in russian).

6. Godden D.J., Baile E.M., Okazawa M., Paré P.D. Hypertonic aerosol inhalation does not alter central airway blood flow in dogs. *J. Appl. Physiol.* 1988; 65(5):1990–1994.

7. Li M.C., Yang G., Zhou X.D., Tseluyko S.S., Perelman J.M. The pathophysiological mechanisms underlying mucus hyper secretion induced by cold temperatures in cig-

arette smoke-exposed rats. *Int. J. Mol. Med.* 2014; 33(1):83–90.

8. Mochizuki H., Ohki Y., Arakawa H., Tokuyama K., Morikawa A. Effect of ultrasonically nebulized distilled water on airway epithelial cell swelling in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* 1999; 86(5):1505–1512.

9. Schoeffel R.E., Anderson S.D., Altounyan R.E. Bronchial hyperreactivity in response to inhalation of ultrasonically nebulised solutions of distilled water and saline. *Br. Med. J.* 1981; 283(6302):1285–1287.

Поступила 05.08.2015

Контактная информация

Сергей Семенович Целуйко,

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии,

Амурская государственная медицинская академия,

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

E-mail: agma@nm.ru

Correspondence should be addressed to

Sergey S. Tseluyko,

MD, PhD, Professor, Head of Department of Histology,

Amur State Medical Academy,

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

E-mail: agma@nm.ru