

3. *Попович М. И.* Тракционная травма элементов сосудисто-нервного пучка // Оренбургский медицинский вестник. 2014. Т. 2, № 3(7). С. 19–23.

*Павлов А. В., Тюмина Н. А.,
Кемоклидзе К. Г., Есев Л. И.*

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ РЕСНИЧАТЫХ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ГЛАВНЫХ БРОНХОВ КРЫС В ПЕРВЫЙ МЕСЯЦ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

*Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (заведующий – проф. А. В. Павлов)
Ярославского государственного медицинского университета, Ярославль,
e-mail: Natellamail@mail.ru*

Мукоцилиарный транспорт является важным механизмом очистки поверхности слизистой оболочки воздухоносных путей от частиц пыли и микроорганизмов, оседающих на ней при дыхании, эффективность которого напрямую связана с биением ресничек мерцательных клеток, перемещающих слизь по поверхности слизистой оболочки [1]. Меняющиеся в ходе онтогенеза состояния мерцательного эпителия и железистого аппарата воздухоносных путей закономерно отражаются и на выраженности мукоцилиарного транспорта в тот или иной возрастной период.

Онтогенетические характеристики микроскопической структуры и функциональной активности эпителиальной выстилки воздухоносных путей наиболее подробно изучены применительно к носовой полости и трахее [3, 8, 10, 12] и в гораздо меньшей степени – в бронхиальном дереве [11, 13]. При этом исследовались лишь отдельные возрастные периоды с использованием не всегда сопоставимого набора методов, а морфологические и функциональные характеристики, как правило, изучались раздельно.

Проведенный ранее на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ЯГМУ анализ возрастных закономерностей становления структуры и функции мукоцилиарной транспортной системы трахеи [3] свидетельствует о перспективности продолжения исследований в данном направлении с целью получения целостной картины возрастной гистофизиологии мукоцилиарного аппарата воздухоносных путей. Кроме того, целесообразно совместить данные, получаемые при исследовании мукоцилиарного транспорта с такими важными морфометрическими показателями, отражающими зрелость и функциональную активность клеток, как их размеры, размеры ядер и ядерно-цитоплазматическое отношение.

Цель исследования – комплексное изучение динамики морфометрических (цитометрия, содержание в пласте) и функциональных (частота биения ресничек) показателей реснитчатых эпителиоцитов главных бронхов крыс на протяжении первого месяца постнатального развития крыс.

Материал и методы. Изучены главные бронхи 25 крыс-самцов породы Вистар возрастом 1 (новорожденные), 14 (подсосный период) и 30 (инфантильные животные) суток [1], по 5–10 животных на каждый срок.

Изучение частоты биения ресничек и длины ресничек мерцательных клеток проводили на прижизненных препаратах по методике, ранее описанной для трахеи [4]. Извлеченные из животных кусочки бронхов помещались в питательную среду «Игла MEM для культур клеток», предварительно подогретую до 37 °С для поддержания оптимальных условий для биения ресничек. Регистрацию видеофайлов проводили с помощью модернизированной версии программно-аппаратного комплекса НПО «Азимут», включающего микроскоп ЛОМО Микмед-6 с термостолком, высокоскоростной цифровой видеокамеры и электронного блока терморегулирования. Полученные видеофайлы обрабатывали с помощью специализированной прикладной программы MOSFRO.

Для гистологического исследования главные бронхи от 5 животных в каждой возрастной группе фиксировали в 10 %-ном формалине и заливали в парафин, срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином с эозином и реактивом Шиффа (ШИК-реакция) с подкраской ядер гематоксилином. С полученных препаратов делали цифровые фотографии (суммарное увеличение $\times 1000$), на которых с помощью прикладной морфометрической программы Image J производили автоматическое вычисление площадей микроструктур после обведения периметров объектов (100 реснитчатых клеток у животного). Частоту мерцательных клеток в пласте рассчитывали на основании подсчета 1000 клеток у каждого животного. Все количественные параметры обрабатывали методами вариационной статистики.

Результаты исследования. Главные бронхи новорожденных крыс выстланы двухрядным эпителием, в составе которого обнаруживаются реснитчатые и базальные клетки, однако преобладающим типом являются промежуточные эпителиоциты без признаков специфической дифференцировки (рис. 1А), в последующие две недели количество реснитчатых клеток в пласте существенно возрастает (рис. 1Б). К концу первого месяца эпителий продолжает оставаться преимущественно двухрядным, с высоким содержанием реснитчатых элементов, в этот период впервые появляется возможность идентифицировать бокаловидные экзокриноциты (рис. 1В).

Средняя площадь сечения мерцательных клеток в эпителиальном пласте главных бронхов у новорожденных крыс сильно варьирует, с преобладанием крупных элементов ($97, \pm 12,7 \text{ мкм}^2$). К 14 суткам данный показатель снижается до $68,7 \pm 1,2 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,05$) и сохраняется на этом уровне до конца 1 месяца ($71,9 \pm 4,7 \text{ мкм}^2$). Средняя площадь сечения ядер максимальна у новорожденных крыс ($31,1 \pm 4,7 \text{ мкм}^2$), к 14 суткам снижается до $21,3 \pm 4,4 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,05$) и к концу 1 месяца остается неизменной ($23,8 \pm 1,6 \text{ мкм}^2$). Как следствие сходной динамики этих показателей величина ядерно-цитоплазматического отношения на все сроки сохраняется на стабильном уровне ($0,5 \pm 0,1$).

Частота реснитчатых клеток в пласте минимальна у новорожденных крыс ($20,6 \pm 1,2\%$), к 14 суткам она вырастает до $45,4 \pm 6,4\%$ ($p < 0,05$) и стабилизируется на этом уровне к концу первого месяца жизни животных: ($52,4 \pm 9,2\%$).

Частота биения ресничек достигает наибольших значений у новорожденных крыс ($25,3 \pm 2,4 \text{ Гц}$), снижается до $15,9 \pm 1,7 \text{ Гц}$ на 14-й день ($p < 0,05$) и остается на этом уровне к 30 суткам ($18,7 \pm 0,8 \text{ Гц}$). Длина ресничек мерцательных клеток, измеренная на видеофайлах на протяжении 1 месяца жизни животных (рис. 1Г) остается стабильной ($4,4\text{--}6,5 \text{ мкм}$, $p < 0,05$).

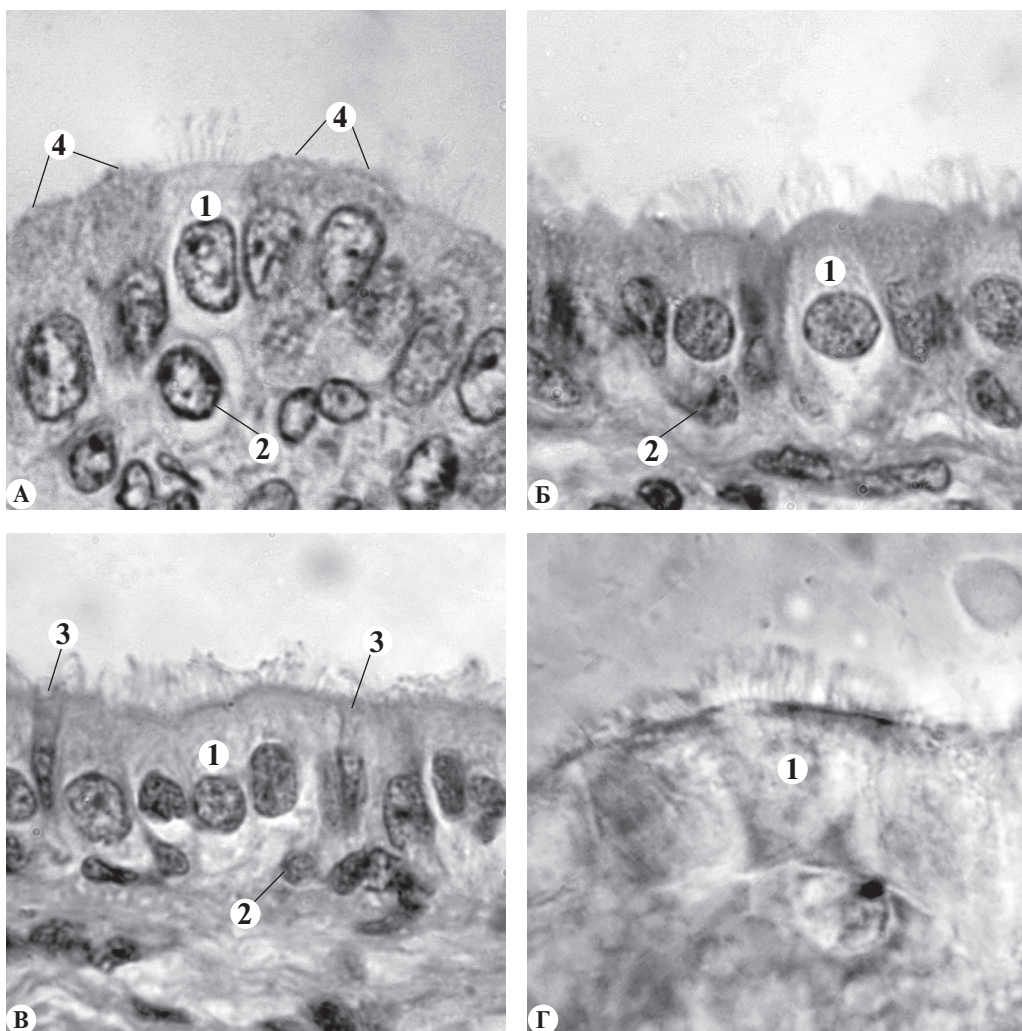


Рис. 1. Многорядный реснитчатый эпителий главных бронхов крыс в возрасте новорожденности (А, Г); двух недель (Б) и одного месяца (В). 1 – реснитчатые клетки; 2 – базальные клетки; 3 – бокаловидные клетки; 4 – специфически недифференцированные клетки.

А, Б, В – окраска гематоксилином и эозином; Г – кадр прижизненной микровидеосъемки.

Об 100, ок. 10

Обсуждение полученных данных. Более крупные размеры большинства реснитчатых клеток и их ядер в эпителии главных бронхов крыс в период новорожденности свидетельствуют, что именно в это время они обладают наиболее активным синтетическим аппаратом, обеспечивающим активизацию затратных с энергетической и структурной точек зрения механизмов пролиферации и дифференцировки клеток (цилиогенез). Важнейшим проявлением данных процессов является двукратный рост частоты реснитчатых эпителиоцитов в пласте в течение первых двух недель после рождения. На начальных этапах развития для исследованного типа клеток характерна высокая вариабельность средних разме-

ров и их ядер, снижающаяся по мере формирования дефинитивной структуры эпителия. При этом у всех изученных возрастных групп величины ядерно-цитоплазматического соотношения морфологически дифференцированных мерцательных клеток не изменяются.

Полученные количественные результаты в целом совпадают с данными литературы, полученными при изучении морфологии верхних отделов воздухоносных путей [3, 5, 8, 9], свидетельствующих, что именно в этот период наблюдаются наиболее активные процессы цилиогенеза и дифференцировки респираторного эпителия.

Возрастная динамика частоты биения ресничек в главных бронхах на протяжении первого месяца жизни животных с максимальными значениями у новорожденных совпадает с таковой в носовой полости и трахее лабораторных животных и человека [3, 5, 6, 7, 10, 12] и хорошо соотносится с приведенными выше данными по количественной морфологии мерцательных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Завалий М. А.* Морфогенез мерцательного эпителия // Ринология. 2014. № 1. С. 38–49.
2. *Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А.* Лабораторные животные. Разведение, содержание и использование в эксперименте. Киев: Вища школа, 1974.
3. *Павлов А. В., Есев Л. И.* Гистофизиология эпителия трахеи у крыс в постнатальном онтогенезе // Морфология. 2014. Т. 146, вып. 6. С. 80–86.
4. *Павлов А. В., Есев Л. И.* Методические подходы к комплексному изучению функциональной морфологии эпителиальной выстилки трахеи в эксперименте // Морфология. 2012. Т. 142, вып. 6. С. 73–76.
5. *Francis R. J., Chatterjee B., Loges N. T. et al.* Initiation and maturation of cilia-generated flow in newborn and postnatal mouse airway // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2009. Vol. 296(6). P. 1067–1075.
6. *Ho J. C., Chan K. N., Hu W. H. et al.* The effect of aging on nasal mucociliary clearance, beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. Vol. 163(4). P. 983–988.
7. *Joki S., Saano V.* Influence of ageing on ciliary beat frequency and on ciliary response to leukotriene D4 in guinea-pig tracheal epithelium // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1997. Vol. 24(2). P. 166–169.
8. *Kawamata S., Fujita H.* Fine structural aspects of the development and aging of the tracheal epithelium of mice // Arch. Histol. Jpn. 1983. Vol. 46(3). P. 355–372.
9. *Leigh M. W., Gambling T. M., Carson J. L. et al.* Postnatal development of tracheal surface epithelium and submucosal glands in the ferret // Exp. Lung. Res. 1986. Vol. 10(2). P. 153–169.
10. *O'Callaghan C., Smith K., Wilkinson M. et al.* Ciliary beat frequency in newborn infants // Arch. Dis. Child. 1991. Vol. 66(4). P. 443–444.
11. *Puchelle E., Zahm J. M., Bertrand A.* Influence of age on bronchial mucociliary transport // Scandinavian journal of respiratory diseases. 1979. Vol. 60. P. 307–313.

12. Voter K. Z., Leigh M. W., Boat T. F. et al. Development of mucociliary transport in the postnatal ferret trachea // J. Appl. Physiol. 1992. Vol. 73(4). P. 1500–1503.
13. Yager J. A., Ellman H., Dulfano M. J. Human ciliary beat frequency at three levels of the tracheobronchial tree // Am. Revol. Respir. Dis. 1980. Vol. 121(4). P. 661–665.

Петрова Е. С., Колос Е. А.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО НЕРВА КРЫСЫ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ: ПЕРИФЕРИНА, АЛЬФА-АКТИНА, PCNA

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (заведующий – профессор РАН Д. Э. Коржевский) Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Несмотря на то, что изучение восстановления нерва после травмы имеет многолетнюю историю, проблема стимуляции регенерации периферических нервных проводников остается актуальной. Это связано с тем, что множество экспериментальных и клинических разработок в этом направлении не приводит к полному функциональному восстановлению поврежденного нерва. В настоящее время применяются различные способы ускорения регенерации нервных проводников. Используются лекарственные средства [14], влияние магнитного поля [5], применяется электростимуляция [9], совершенствуются методы шовной техники [1] и нейропластики [4], создаются специальные кондуиты, которые могли бы заменить аутотрансплантат фрагмента нерва, применяемый в хирургической практике для соединения проксимального и дистального участков травмированного нерва [8, 11]. Проводятся разработки по улучшению регенерации нервных проводников с помощью применения клеточных и генных технологий [2, 8, 11]. Для оценки степени восстановления поврежденных нервов используются разные методы. Помимо поведенческих тестов и электрофизиологических методов оценки проводимости нервных проводников важен морфологический анализ регенерирующих нервных волокон. Цель настоящей работы – отработать методы оценки степени восстановления нерва после травмы с помощью иммуногистохимического выявления периферина (PE), белка пролиферирующих клеток PCNA и альфа-актина.

Работа выполнена на крысах Вистар (n = 20). У подопытных животных на уровне верхней трети бедра повреждали седалищные нервы путем наложения лигатуры (в течение 40 с). При работе с животными руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 года). Через 21 и 30 суток после операции выделяли фрагменты нерва в области повреждения (1,5 см) и фрагменты на расстоянии 7–8 мм дистальнее места повреждения (3 мм), фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [3]. Сроки были выбраны с учетом