

УДК: 611.233: 591.873

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОПУЛЯЦИИ РЕСНИЧЧАТЫХ
ЭПИТЕЛИОЦИТОВ БРОНХОВ КРЫС В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ДЕФИНИТИВНОЙ
СТРУКТУРЫ ЛЕГКИХ**

Н.А. ТЮМИНА

*ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России,
ул. Революционная, д. 5, Ярославль, 150000, Россия, e-mail: Natellamail@mail.ru*

Аннотация. С помощью технологии прижизненного изучения частоты биения ресничек *in vitro* (высокоскоростная видеосъемка с последующей компьютерной обработкой цифровых файлов) в сочетании с гистологическими и морфометрическими (цитометрия, определение ядерно-цитоплазматического отношения) методами изучен мерцательный эпителий крупных (главных), средних (долевых) и мелких (сегментарных) бронхов легких 40 крыс Вистар от рождения до достижения ими репродуктивного возраста (6 мес.). Дифференцировка популяции реснитчатых клеток наиболее интенсивно происходит на протяжении первого месяца жизни животного: в течение этого периода частота реснитчатых клеток в эпителии возрастает в 2,5-3,3 раза, содержание мерцательных элементов в средних и малых бронхах в среднем на 25-30% выше по сравнению с крупными бронхами. Частота биения ресничек в бронхах крупного, среднего и малого калибра достигает наибольших значений у новорожденных животных (25-25,9 Гц), снижается до 15,1-15,9 Гц у месячных крыс и стабилизируется на этом уровне на все последующие сроки. Респираторный эпителий бронхиального дерева развивается, как единая тканевая система; при этом наиболее высокие темпы структурной дифференцировки популяции реснитчатых клеток характерны для мелких бронхов.

Ключевые слова: респираторный эпителий, бронхи, морфометрия, частота биения ресничек, постнатальный онтогенез.

**QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF RATS BRONCHIAL CILIATED EPITHELIUM
IN DEVELOPMENT OF DEFINITIVE STRUCTURE OF LUNGS**

N.A. TIUMINA

*Yaroslavl State Medical University, Revolutionary str., 5, Yaroslavl, 150000, Russia,
e-mail: Natellamail@mail.ru*

Abstract. With the help of a technique of *in vivo* study of the cilia beat frequency *in vitro* (high-speed video filming with the subsequent computer processing of digital files) in combination with histologic and morphometric (a cytometry, estimation of nucleocytoplasmic ratio) methods the ciliated epithelium of large (main), average and small bronchial tubes of lungs from 40 Wistar rats from birth to reproductive age (6 months) was investigated. The differentiation of ciliated cells population most intensively develops over the first month: during this period the frequency of ciliated cells increases by 2,5-3,3 times; the maintenance of ciliated elements in average and small bronchial tubes is on 25-30% higher in comparison with large bronchial tubes. Cilia beat frequency in bronchial tubes of large, average and small caliber reaches the greatest values in newborn animals (25-25,9 Hz), decreases to 15,1-15,9 Hz at monthly rats and is stabilized at this level for all subsequent age groups. The respiratory epithelium of bronchial tubes develops as uniform tissue system, at the same time the highest rates of a structural differentiation of population of ciliated cells are characteristic for small bronchial tubes.

Keywords: respiratory epithelium, bronchial tubes, morphometry, cilia beat frequency, postnatal ontogenesis.

Введение. Многорядный мерцательный эпителий является сложной тканевой системой, играющей ключевую роль в обеспечении деятельности мукоцилиарного аппарата воздухоносных путей [6]; эффективность последнего напрямую связана с биением ресничек мерцательных клеток, перемещающих слизь по внутренней поверхности бронхов и трахеи [1, 3]. Возрастные особенности микроскопической структуры и функциональной активности эпителиальной выстилки воздухоносных путей наиболее подробно изучены в трахее [4, 8-10] и в гораздо меньшей степени – в бронхиальном дереве [11-13]. В последнем случае, как правило, исследовались лишь отдельные возрастные периоды с использованием не всегда сопоставимого набора гистологических, морфометрических и функциональных методов. Проведенный ранее на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии Ярославского государственного медицинского университета углубленный анализ возрастных закономерностей структурной и функциональной организации мукоцилиарной транспортной системы трахеи [4] свидетельствует о перспективности

продолжения исследований в данном направлении с целью получения целостной картины возрастных особенностей гистофизиологии мукоцилиарного аппарата воздухоносных путей.

Цель исследования – изучение динамики морфометрических (цитометрия, содержание в пласте) и функциональных (частота биения ресничек) показателей реснитчатых (мерцательных) эпителиоцитов бронхиального дерева крыс с момента рождения до достижения ими репродуктивного возраста.

Материалы и методы исследования. Изучены бронхи крупного (главные), среднего (долевые) и малого (сегментарные) калибра 40 крыс-самцов породы Вистар (по 5-10 животных на срок) в период молочного кормления (новорожденные – 1 сут., подсосный возраст – 14 сут.), период полового созревания (инфантильные животные – 1 мес., ювенильные животные – 2 и 3 месяца) и репродуктивный период (молодые животные – 6 мес.) [2].

Изучение частоты биения ресничек и длины ресничек мерцательных клеток проводили на прижизненных препаратах по методике, ранее детально описанной для трахеи крыс [5]. Извлеченные из наркотизированных животных фрагменты главных бронхов и легких помещались в питательную среду, предварительно подогретую до 37°C для поддержания оптимальных условий для биения ресничек. Регистрацию видеофайлов проводили с помощью модернизированной версии программно-аппаратного комплекса НПО «Азимут» (Россия), включающего микроскоп ЛОМО Микмед-6 с термостолком, высокоскоростную цифровую видеокамеру, персональный компьютер и электронный блок терморегулирования; полученные видеофайлы обрабатывали с помощью специализированной прикладной программы *MOSFRO*. Для гистологического исследования легкие от 5 животных в каждой возрастной группе фиксировали в 10% формалине и заливали в парафин, срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилином с эозином. С полученных препаратов делали цифровые фотографии (суммарное увеличение $\times 1000$), на которых с помощью прикладной морфометрической программы *ImageJ* 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 и их обсуждение. Динамика количественных показателей популяции реснитчатых клеток бронхов разного калибра на протяжении первых 6 месяцев постнатального развития крыс представлена в табл.

Бронхиальное дерево новорожденных крыс выстлано однослойным эпителием (двухрядным в главных бронхах, переходящим в однорядный по мере уменьшения калибра), содержащим реснитчатые, базальные и промежуточные (недифференцированные) эпителиоциты; содержание мерцательных элементов в этот период минимально: 21% в крупных и мелких бронхах и 26% – в средних бронхах. На протяжении последующих двух недель частота реснитчатых эпителиоцитов в пласте значительно увеличивается: в 2,2 раза в крупных, в 2,3 раза – в средних и в 2,7 раза – в малых (мелких) бронхах ($p < 0,05$). К 30 суткам содержание реснитчатых элементов возрастает по сравнению с новорожденными соответственно в 2,5 раза – для крупных, в 2,7 раза – для средних и в 3,3 раза для мелких бронхов ($p < 0,05$), эти показатели сохраняются на стабильном уровне для каждого калибра бронхов на протяжении всего периода полового созревания (1-3 мес.). При этом относительное количество реснитчатых клеток в средних и малых бронхах в среднем на 25-30% выше по сравнению с крупными бронхами ($p < 0,05$), к 6 мес. эта закономерность сохраняется только для мелких бронхов (+25%).

Средняя площадь сечения мерцательных клеток в эпителиальном пласте крупных бронхов у новорожденных крыс максимальна (97,2 мкм²) благодаря высокому содержанию в пласте крупных элементов, при этом размеры клеток существенно варьируют. В средних и малых бронхах средние значения данного показателя существенно (соответственно на 50 и 60%) ниже ($p < 0,05$). В дальнейшем, динамика средних размеров клеток для бронхов разного калибра носит разнонаправленный характер: к 30 суткам в крупных бронхах величина данного параметра уменьшается на 25% ($p < 0,05$), в средних и малых бронхах – возрастает соответственно на 48 и 35% ($p < 0,05$). Вследствие этих процессов во все последующие сроки средняя площадь сечения клеток в крупных и средних бронхах стабилизируется на уровне 72-79 мкм² ($p > 0,05$ по сравнению с возрастными группами и калибром бронхов); в мелких бронхах – на уровне 48-54 мкм² ($p < 0,05$ по сравнению с более крупными бронхами в каждой возрастной группе). В целом, для каждого уровня ветвления бронхов средняя площадь сечения ядер изменяется аналогично средней площади сечения мерцательных клеток. Этим объясняется сохранение достаточно стабильной возрастной динамики величин их ядерно-цитоплазматического отношения, несмотря на существенные колебания абсолютных размеров клеток. У 3-6-месячных животных значения данного показателя минимальны в крупных бронхах (0,36) и максимальны в малых бронхах (0,47-0,49).

Возрастная динамика структуры и функции реснитчатых клеток бронхов крыс

Калибр бронха	Периоды, возраст					
	Молочного кормления		Полового созревания			Репродуктивный
	Нов.	2 нед.	1 мес.	2 мес.	3 мес.	6 мес.
<i>а) содержание в пласте, %</i>						
1. Крупный	20,6±1,2	45,4±4,4*	52,4±5,2	54,0±4,7	59,3±3,3	54,6±4,1
2. Средний	26,5±1,7	59,6±1,3*	71,4±1,2*	70,9±0,7	68,0±2,1	59,9±1,8*
3. Малый	21,0±1,8	56,5±2,1*	69,6±2,5*	67,7±1,4	71,2±1,8	68,4±2,4
<i>p</i> _{1,2}	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05
<i>p</i> _{1,3}	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
<i>p</i> _{2,3}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
<i>б) средняя площадь сечения клетки, мкм²</i>						
1. Крупный	97,2±12,7	68,7±1,2*	71,9±4,7	75,1±2,3	78,3±3,8	76,1±3,1
2. Средний	49,4±7,9	64,0±7,8*	73,3±7,7	74,4±1,9	76,9±1,5	74,6±2,4
3. Малый	38,9±2,9	63,1±11,4*	53,2±8,6	48,4±2,7	54,5±2,1	52,1±1,0
<i>p</i> _{1,2}	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<i>p</i> _{1,3}	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
<i>p</i> _{2,3}	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
<i>в) средняя площадь сечения ядра клетки, мкм²</i>						
1. Крупный	31,1±4,7	21,3±4,4*	23,8±1,6	24,1±1,2	19,1±2,8	18,8±1,9
2. Средний	15,6±3,2	23,8±4,6*	18,5±4,1	19,9±1,8	22,3±2,2	21,8±1,5
3. Малый	10,8±0,1	19,6±4,5*	13,3±3,7	16,1±2,3	17,8±2,2	16,7±1,8
<i>p</i> _{1,2}	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<i>p</i> _{1,3}	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05
<i>p</i> _{2,3}	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<i>г) ядерно-цитоплазменное отношение</i>						
1. Крупный	0,47	0,45	0,49	0,47	0,32	0,32
2. Средний	0,46	0,59	0,34	0,37	0,41	0,41
3. Малый	0,38	0,45	0,33	0,49	0,49	0,47
<i>д) частота биения ресничек, Гц</i>						
1. Крупный	25,3±2,4	15,9±1,7*	18,7±0,8	15,0±1,3*	14,0±2,6	13,6±0,2
2. Средний	25,9±1,4	15,9±1,9*	14,1±0,9	13,9±1,3	14,0±0,9	13,3±1,0
3. Малый	25,0±1,7	15,1±2,9*	14,9±2,0	14,5±1,1	14,4±3,1	14,2±0,8
<i>p</i> _{1,2}	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<i>p</i> _{1,3}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<i>p</i> _{2,3}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим возрастным периодом

Изучение функциональных характеристик мерцательного аппарата показало, что частота биения ресничек (ЧБР) в бронхах крупного, среднего и малого калибра достигает наибольших значений у новорожденных (25-25,9 Гц); к 14 суткам данный показатель снизился на 37-40% (15,1-15,9 Гц; $p < 0,05$). У месячных животных ЧБР в средних и малых бронхах на 21-25% ниже, чем в крупных ($p < 0,05$), на все последующие сроки различий в мерцательной активности между бронхами разного калибра не выявлено ($p > 0,05$). В репродуктивном возрасте (6 мес.) значения ЧБР во всех отделах бронхиального дерева составляют 53-57% от уровня новорожденных животных.

Результаты исследования свидетельствуют, что на всех уровнях ветвления бронхиального дерева дифференцировка эпителиального пласта идет наиболее интенсивно в течение первого месяца жизни животного. К 30 суткам в результате активных процессов цилиогенеза содержание в эпителии реснитчатых клеток приближаются к уровню половозрелых животных, однако темпы роста данного показателя оказались отчетливо выше в малых бронхах по сравнению со средними и крупными бронхами.

Возрастная динамика двигательной активности цилиарного аппарата реснитчатых эпителиоцитов в изученных отделах бронхиального дерева сходна с таковой в трахее лабораторных животных и человека [4,7,8] и хорошо коррелирует с полученными в ходе настоящего исследования данными по количественной морфологии популяции мерцательных клеток.

Заключение. Респираторный эпителий бронхов развивается и функционирует, как единая тканевая система; при этом наиболее высокие темпы структурной дифференцировки популяции реснитчатых клеток характерны для мелких бронхов. Выявленные особенности структуры и функции мерцательных эпителиоцитов отражают неравномерный темп гистогенетических процессов в различных отделах бронхиального дерева в период становления дефинитивной структуры легких.

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. 303 с.
3. Захарова Г.П., Янов Ю.К., Шабалин В.В. Мукоцилиарная система верхних дыхательных путей. СПб.: Диалог, 2010. 360 с.
4. Павлов А.В., Есев Л.И. Гистофизиология эпителия трахеи у крыс в постнатальном онтогенезе // Морфология. 2014. № 146 (6). С. 80–86.
5. Павлов А.В., Есев Л.И. Методические подходы к комплексному изучению функциональной морфологии эпителиальной выстилки трахеи в эксперименте // Морфология. 2012. № 142 (6). С. 73–76.
6. Шубникова Е.А. Эпителиальные ткани. Руководство по гистологии. В 2 томах. Т. I, 2-е изд. СПб.: СпецЛит, 2011. С. 124–202.
7. Francis R.J., Chatterjee B., Loges N.T. Initiation and maturation of cilia-generated flow in newborn and postnatal mouse airway // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2009. № 296 (6). P. 1067–1075.
8. 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. № 24 (2). P. 166–169.
9. Kawamata S., Fujita H. Fine structural aspects of the development and aging of the tracheal epithelium of mice // Arch. Histol. Jpn. 1983. № 46 (3). P. 355–372.
10. Leigh M.W., Gambling T.M., Carson J.L. Postnatal development of tracheal surface epithelium and submucosal glands in the ferret // Exp. Lung. Res. 1986. № 10 (2). P. 153–169.
11. Puchelle E., Zahm J.M., Bertrand A. Influence of age on bronchial mucociliary transport // Scand. J. Resp. Dis. 1979. № 60. P. 307–313.
12. Van Winkle L.S., Fanucchi M.V., Miller L.A. Epithelial cell distribution and abundance in rhesus monkey airways during postnatal lung growth and development // J Appl Physiol. 2004. № 97(6). P. 2355–2363.
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. № 121 (4). P. 661–665.

References

1. Zavalij MA. Morfogenez mercatel'nogo ehpiteliya [Morphogenesis of the ciliated epithelium]. Rinologiya. 2014;1:38-49. Russian.
2. Zapadnyuk IP, Zapadnyuk VI, Zahariya EA. Laboratornye zhivotnye [Laboratory animals]. Razvedenie, sodержanie i ispol'zovanie v ehksperimente. Kiev: Vishcha shkola; 1974. Russian.
3. Zaharova GP, YAnov YUK, SHabalin VV. Mukociliarnaya sistema verhnih dyhatel'nyh putej [Mucociliary system of the upper respiratory tract]. Sankt-Peterburg: Dialog; 2010. Russian.
4. Pavlov AV, Esev LI. Gistofiziologiya ehpiteliya trahei u krys v postnatal'nom ontogeneze [histology of tracheal epithelium in rats in postnatal ontogenesis]. Morfologiya. 2014;146 (6): 80-6. Russian.

5. Pavlov AV, Esev LI. Metodicheskie podhody k kompleksnomu izucheniyu funkcional'noj morfologii ehptelial'noj vystilki trahei v ehksperimente [Methodological approaches to the complex study of the functional morphology of the epithelial lining of the trachea in the experiment]. *Morfologiya*. 2012;142 (6):73-6. Russian.

6. SHubnikova EA. EHptelial'nye tkani. Rukovodstvo po gistologii [Epithelial tissues. Guide to histology]. V 2 tomah. T. I, 2-e izd. Sankt-Peterburg: SpecLit; 2011. Russian.

7. Francis RJ, Chatterjee B, Loges NT. Initiation and maturation of cilia-generated flow in newborn and postnatal mouse airway. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2009;296 (6):1067-75.

8. 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;24 (2):166-9.

9. Kawamata S, Fujita H. Fine structural aspects of the development and aging of the tracheal epithelium of miceyu *Arch. Histol.Jpn.* 1983;46 (3):355-72.

10. Leigh MW, Gambling TM, Carson JL. Postnatal development of tracheal surface epithelium and submucosal glands in the ferret. *Exp. Lung. Res.* 1986;10 (2):153-69.

11. Puchelle E, Zahm JM, Bertrand A. Influence of age on bronchial mucociliary transport. *Scand.J. Resp. Dis.* 1979;60:307-13.

12. Van Winkle LS, Fanucchi MV, Miller LA. Epithelial cell distribution and abundance in rhesus monkey airways during postnatal lung growth and development. *J Appl Physiol.* 2004;97(6):2355-63.

13. Yager JA, Ellman H, Dulfano MJ. Human ciliary beat frequency at three levels of the tracheobronchial tree. *Am. Revol. Respir. Dis.* 1980; 121 (4):661-5.

Библиографическая ссылка:

Тюмина Н.А. Количественные характеристики популяции реснитчатых эпителиоцитов бронхов крыс в процессе формирования дефинитивной структуры легких // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №5. Публикация 3-17. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-5/3-17.pdf> (дата обращения: 30.10.2018). *

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-5/e2018-5.pdf>