

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2018
УДК 001.891.5:612.627:599.323.4

А. В. Павлов¹, Т. В. Кораблева¹, Л. И. Есев¹, О. А. Фоканова¹, Ю. А. Лукашевич²

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ИЗУЧЕНИЮ ГИСТОФИЗИОЛОГИИ МУКОЦИЛИАРНОЙ ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ МАТОЧНЫХ ТРУБ

¹ Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. В. Павлов), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; ² кафедра инфокоммуникаций и радиофизики (зав. — проф. Ю. А. Брюханов), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет имени П. Г. Демидова»

Цель — разработка методики экспериментального изучения мукоцилиарного аппарата маточных труб на основе использования современных цифровых технологий.

Материал и методы. С помощью комплекса гистологических и специализированного программно-аппаратного комплекса «Азимут» (Россия) изучена структурно-функциональная организация маточных труб мелких лабораторных животных.

Результаты и выводы. Предложены методические подходы, позволяющие провести комплексный морфофункциональный анализ, включающий прижизненное изучение скорости движения слизи на уровне органа и в пристеночном слое, параметров двигательной активности цилиарного аппарата, линейных размеров микроскопических объектов в сочетании с гистологическим исследованием маточных труб.

Ключевые слова: маточные трубы, эпителиальная выстилка, частота биения ресничек, скорость движения слизи, морфометрия

Эффективная работа мукоцилиарной транспортной системы (МЦТС) маточных труб (МТ), наряду с перистальтическими сокращениями гладкомышечных элементов, является важнейшим механизмом, обеспечивающим транспортную функцию органа [6, 8]. С целью ее изучения в экспериментальных условиях (мыши, морские свинки, крысы, коровы) в литературе описаны различные методические подходы к изучению параметров мукоцилиарного транспорта в органе. Скорость движения слизи (СДС) рассчитывается на основе покадрового анализа файлов, полученных при видеомикроскопии фрагментов МТ в опытах *ex vivo*; в качестве инертных маркеров регистрации движения слизи используются полиэстеровые микросферы диаметром 2,8 мкм [7, 9] или мелкие частицы (фрагменты клеток, эритроциты), образовавшиеся при подготовке образца [11]. Частота биения ресничек (ЧБР) рассчитывается при анализе цифровых файлов, полученных методом скоростной микровидеосъемки фрагментов МТ, путем оценки числа фреймов, захватывающих полный цикл биения ресничек и продолжительности одного фрейма

или с помощью компьютерного спектрального анализа на основе одномерного временного преобразования Фурье [1, 5, 9, 10]. При этом технические особенности подготовки материала для прижизненных исследований, регистрации показателей и их математической обработки в работах разных авторов существенно варьируют, а результаты, полученные с помощью различных методических подходов, могут различаться и не всегда сопоставимы [8, 11].

В связи с этим задача отработки оптимальной последовательности и стандартизации техники исполнения исследовательских манипуляций, позволяющих на основе возможностей современных аппаратных технологий и программного обеспечения в максимально короткие сроки изучить структурные и функциональные параметры МЦТС маточных труб экспериментальных животных, сохраняет высокую актуальность.

В рамках ее решения на кафедре гистологии Ярославского государственного медицинского университета отработан и успешно апробирован в практике научных исследований алгоритм функционального и морфологического анализа маточ-

Сведения об авторах:

Павлов Алексей Владимирович (e-mail: pavlov@ysmu.ru), Кораблева Татьяна Владимировна, Есев Леонид Иванович, Фоканова Ольга Анатольевна, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

Лукашевич Юрий Александрович (e-mail: lukashevich.yuriy@gmail.com), кафедра инфокоммуникаций и радиофизики, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет имени П. Г. Демидова», 150003, г. Ярославль, ул. Советская, 14

ных труб мелких лабораторных животных (белые крысы, мыши и морские свинки), включающий: прижизненное исследование (1-й этап), количественный анализ фиксированных макропрепаратов и цифровых фото- и видеофайлов (2-й этап), гистологическое исследование микропрепаратов (3-й этап). Все эксперименты проведены в соответствии с отечественными нормативами и современными международными биоэтическими стандартами по работе с лабораторными животными (закключение этического комитета ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава РФ, протокол № 4 от 18.10.2016 г.).

1. Прижизненное исследование (на примере крыс линии Вистар). Эксперименты выполняли на взрослых наркотизированных животных (уретановый наркоз, 1000 мг/кг внутривенно). Крысу помещали на спину, после чего производили послойные разрезы передней стенки брюшной полости в области ее нижней трети, с помощью ранорасширителя обеспечивали доступ к правой и левой МТ. Последние у крыс представляют «клубок» из петель, соединенных прослойками рыхлой соединительной ткани (рис. 1).

а) Определение скорости движения слизи на уровне органа in vivo. Применительно к МТ применяли методику, основанную на изучении скорости транспорта в слизи биологически инертного красителя [2]. В правую МТ с помощью микрошприца в область воронки вводили 0,05 мкл 0,5% раствора витального красителя трипановый синий (Biochem, Франция) на питательной среде «Игла МЕМ» с L-глутамином. Через 50 с МТ извлекают из брюшной полости и с целью остановки движения слизи фиксируют в 96% этаноле или жидкости Карнуа. Время от введения красителя до погружения в фиксатор составляет 1 мин.

б) Изучение двигательной активности цилиарного аппарата и скорости движения слизи в пристеночном слое ex vivo. Использовали усовершенствованную и адаптированную для условий эксперимента методику прямой видеорегистрации двигательной активности цилиарного аппарата в биоптатах мерцательного эпителия с последующим компьютерным спектральным анализом цифровых видеофайлов на основе одномерного временного преобразования Фурье [1, 3]. Данные подходы реализованы в виде специализированного программно-аппаратного комплекса «Азимут-4» (НПО «Азимут», Санкт-Петербург, Россия). В отличие от исходной версии со скоростной аналоговой видеокамерой, описанной нами ранее [5], в существующей модификации он включает:

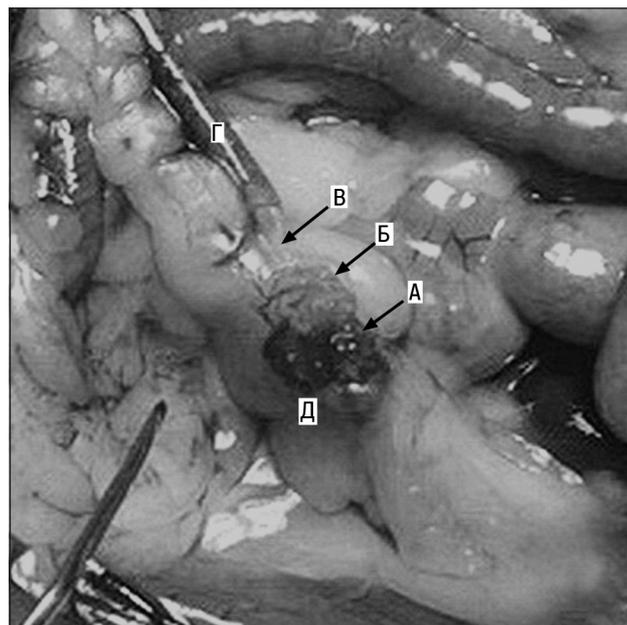


Рис. 1. Макропрепарат маточной трубы у крыс.

А — воронка; Б — ампула; В — перешеек; Г — рог матки (оттянут пинцетом); Д — яичник

- микроскоп Биомед-2 вар.3 (ЛОМО, Россия) с системой оригинального светодиодного освещения с функцией стробоскопии, управляемой в ручном и автоматическом режиме;

- скоростную цифровую видеокамеру Grasshopper 3 2.3 MP Color USB3 Vision (FLIR Integrated Imaging Solutions Inc., Canada), максимальное разрешение 1920×1200 пикселей, частота съемки — 160 Гц;

- высокопроизводительный компьютер с процессором CPU Intel Core i7-6700, памятью DDR4 16Gb 2400 MHz, видеокартой GeForce® GTX 1060 6Gb;

- специализированную компьютерную программу для обработки видеофайлов MOSFRO (v. 4);

- усовершенствованную систему термостатирования НПО «Азимут» (блок управления, термостоллик микроскопа, операционный термостоллик, термостат для объектива).

Данная оригинальная отечественная разработка позволила существенно повысить качество и контрастность изображения за счет эффекта стробоскопии и обеспечить высокую точность измерений; в рамках использования единой программы обработки изображений обеспечивалась возможность:

- на основе автоматического выбора участка измерений и высокой скорости видеозахвата определить не только частоту биения ресничек, но и визуализировать истинную форму их дви-

жения в реальном масштабе времени и рассчитать соотношение фаз (захаха и удара);

- измерить параметры тока жидкости, создаваемого биением мерцательного эпителия в пристеночном слое, включая скорость движения слизи и частиц в ней, форму движения последних (линейно, нелинейно, поступательно, турбулентно);
- сохранять полученные результаты в электронной базе данных и проводить их статистический анализ.

Левую МТ извлекали и переносили в чашку Петри с подогретой до $32 \pm 0,5$ °С средой «Игла MEM» с L-глутамином, помещенную на поверхности термостатика. Под контролем бинокулярного стереомикроскопа Микромед МС-2-ZOOM (вар. 2CR) с помощью пинцетов с минимальной травматизацией производили выделение отделов (воронку и ампулу маточной трубы, а также ее маточную часть) и вручную с помощью лезвия безопасной бритвы изготавливали срезы толщиной не более 1 мм. Оставшиеся отделы МТ помещали в фиксирующую среду для последующего гистологического изучения. Биоптат помещали в лункообразное углубление предметного стекла, запол-

ненного средой «Игла MEM» при температуре 32 °С, накрывали тонким покровным стеклом. Под объективом микроскопа 40 и 100 производили поиск зоны с четкой видимостью движущихся ресничек мерцательного эпителия. Изображение воспроизводили на мониторе компьютера в режиме реального времени. После нахождения одной из зон объекта производили захват сфокусированных изображений с последующим сохранением видеофайлов длительностью 15 с. От одного образца при каждом увеличении записывали не менее 3–5 видеофайлов.

После завершения животных выводили из эксперимента декапитацией. Общая продолжительность этапа — не более 15–20 мин в расчете на 1 животное.

2. Количественный анализ фиксированных макропрепаратов и цифровых фото- и видеофайлов.

а) *Определение скорости движения слизи на уровне органа in vivo.* После фиксации с помощью пинцетов с тонкими браншами появляется возможность «размотать» клубочек МТ без повреждений и в виде трубочки поместить орган на линей-

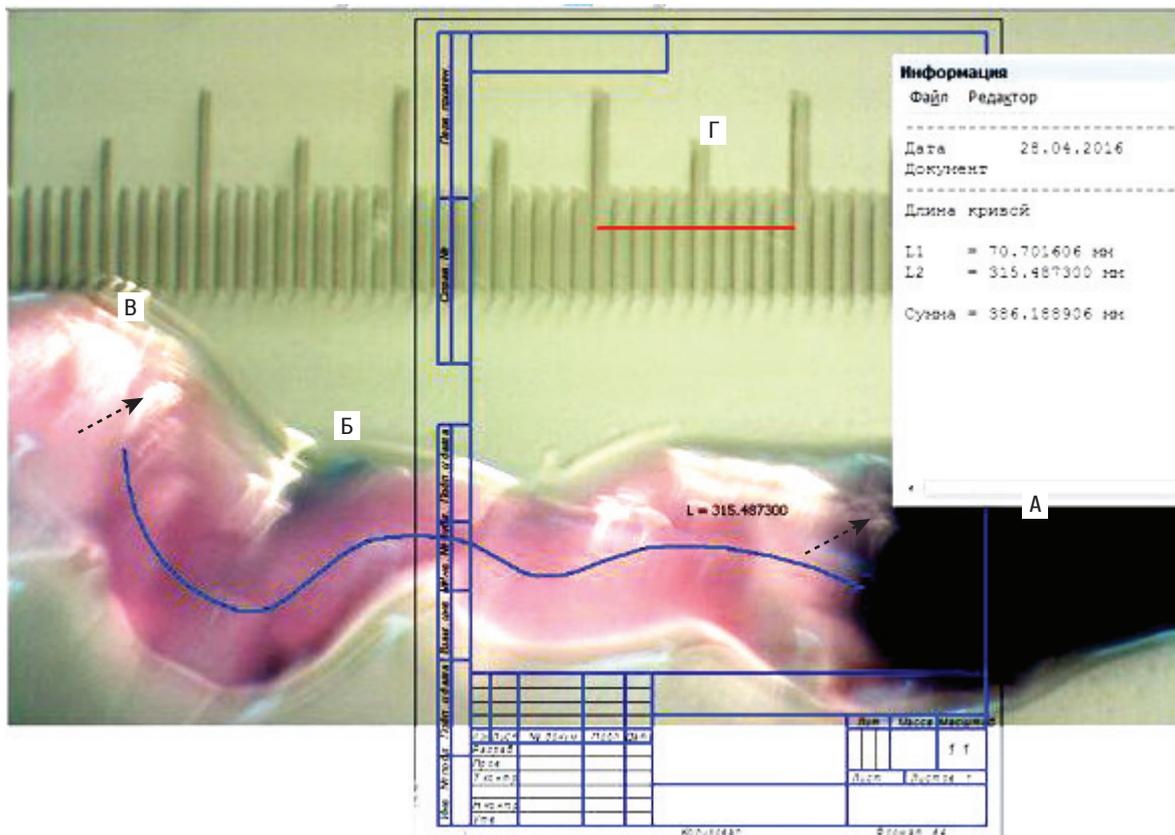


Рис. 2. Определение $СДС_1$ при обработке графического изображения участка фиксированной и отпрепарованной маточной трубы с помощью прикладной программы «Компас-3D».

А — зона введения витального красителя; Б — зона, содержащая разведенный краситель; В — зона неокрашенной слизи; Г — калибровочная шкала, длина линии — 1 мм. Стрелки — начальная и конечная точки измерений длины траектории перемещения слизи (кривая)

ку со шкалой (цена деления 0,1 мм) под стереомикроскоп Микромед МС-2-ZOOM (вар. 2CR) с последующим захватом изображения и созданием файла в графическом формате (рис. 2).

Продвинувшийся за время эксперимента столбик слизи содержит разведенный витальный краситель и приобретает бледно-голубой оттенок, что позволяет на макропрепарате четко определить границы зон введения красителя и неокрашенной слизи. С учетом времени экспозиции между инъекцией красителя и фиксацией органа (60 с) величина СДС₁ (мм/мин) рассчитывается как длина участка МТ, содержащего разведенный витальный краситель, измеренная от места инъекции до четкой границы с неокрашенной жидкостью. С помощью прикладной программы системы автоматического проектирования (САПР) Компас-3D V12 на цифровой фотографии определяли длину отрезка линейки, равного 1 мм (см. рис. 2, г), и длину кривой Безье между начальной и конечной точками (см. рис. 2, стрелки), соответствующую пути прохождения краски за 1 мин.

б) Измерение двигательной активности, линейных размеров цилиарного аппарата и скорости движения слизи в пристеночном слое. Математическая обработка видеофайлов проводилась при помощи специализированной компьютерной программы MOSFRO (v. 4). Последняя позволяет воспроизводить видеофайл, выполнить кадровой просмотр и провести весь комплекс необходимых измерений.

• Подсчет частоты биения ресничек (ЧБР) и измерение линейных размеров проводили на видеофайлах, полученных при использовании объектива 100 (ширина участка захвата — 15 мкм). После запуска видеофайла программа

автоматически фиксировала изменение яркости в движущихся ресничках и рассчитывала частоту колебаний объектов (Гц), а также соотношение и симметричность фаз (замаха и удара).

• Для измерения линейных размеров объектов на монитор выводится фрейм изучаемого видеофрагмента с наиболее сфокусированными микроструктурами (рис. 3, а).

На границы объекта (основание и конец реснички, базальная мембрана и вершина тела клетки) при помощи компьютерной мыши наносили идентификационные точки, после чего программа автоматически рассчитывала величину показателя. Средние значения ЧБР и линейных размеров в расчете на одно животное определяли на основании усреднения результатов не менее 5 измерений на 5–10 видеофайлах.

• Определение скорости движения слизи в пристеночном слое (СДС₂) проводили на видеофайлах, полученных при использовании объектива 40 (ширина участка захвата — 250 мкм). СДС₂ определялась путем измерения пройденного расстояния движущихся мелких микроскопических объектов (частицы, пузырьки воздуха) в поверхностном слое над продольно срезанными участками эпителиальной выстилки МТ за единицу времени. На монитор выводили начальный фрейм изучаемого видеофрагмента, на котором выбирали и обозначали микроскопический объект при помощи компьютерной мыши. После запуска видеофайла программа автоматически определяла длину и время пути частицы и рассчитывала ее скорость (см. рис. 3, б). У каждого животного измеряли не менее 5 микрообъектов в пристеночном слое толщиной 25 мкм в продольном потоке. Длина пробега частиц для измерений составляла 25–150 мкм, диаметр частиц — не более 3 мкм.

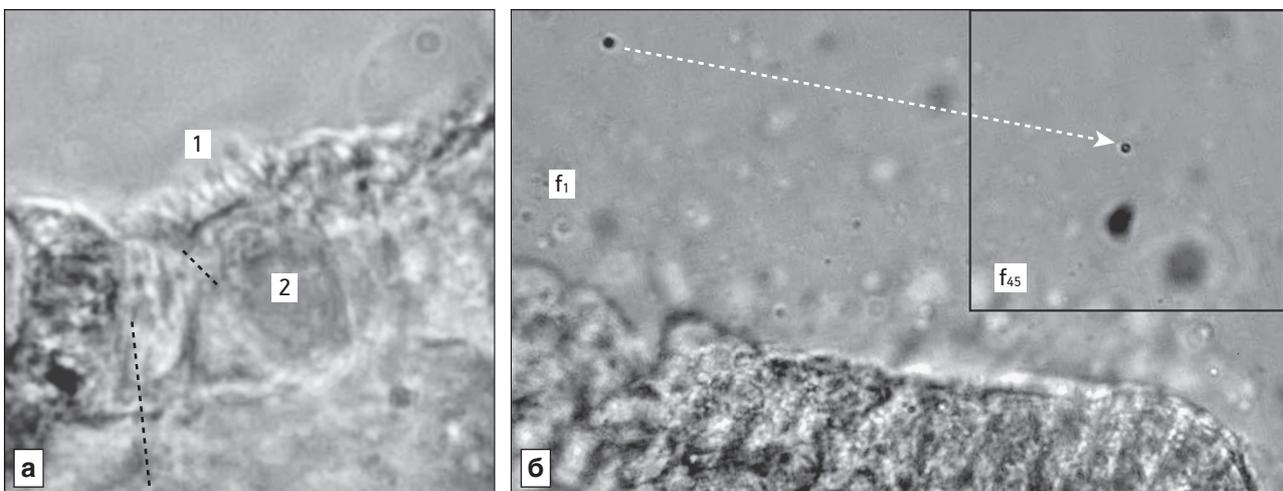


Рис. 3. Фреймы видеофайлов участков эпителия маточных труб при разных увеличениях.

а — определение частоты биения ресничек и линейных размеров микроструктур (линии): 1 — реснички, 2 — тело клетки; б — определение СДС₂ (f₁–f₄₅ — начальный и конечный фреймы, стрелка — траектория перемещения частицы). Ув.: а — 1000; б — 400

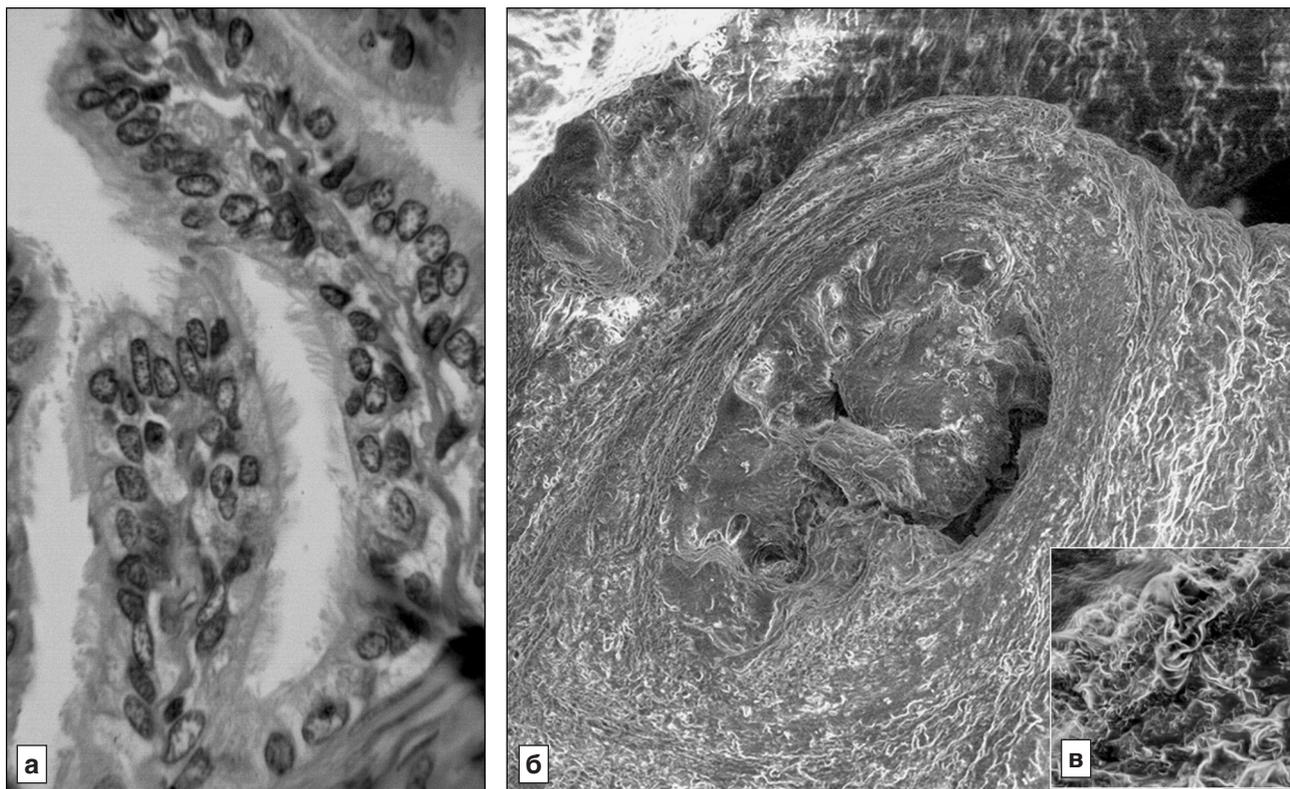


Рис. 4. Морфологическое исследование маточных труб.

а — строение слизистой оболочки. ШИК-реакция с окраской гематоксилином. б, в — рельеф внутренней поверхности органа. Сканирующая электронная микроскопия в режиме низкого вакуума. Ув.: а — 400; б — 250; в — 1750

3. Гистологическое исследование. Особенности методического исполнения данного этапа определяются дизайном конкретного исследования. В формате задач, решаемых в нашей лаборатории, он включал стандартную гистологическую обработку фрагментов МТ (фиксация, заливка в парафин, изготовление срезов толщиной 3–5 мкм), окраску гематоксилином — эозином, проведение ШИК-реакции (рис. 4, а).

Для визуализации внутреннего рельефа МТ проводили исследование фиксированных 10 % формалином фрагментов органа методом низковакуумной сканирующей электронной микроскопии на базе лаборатории Центра коллективного пользования Ярославского филиала Физико-технологического института РАН «Диагностика микро- и наноструктур» (см. рис. 4, б, в).

Таким образом, предложенная последовательность и техническая реализация этапов изучения морфофункциональной организации эпителиальной выстилки маточных труб позволяет за короткий период времени (до 20 мин в расчете на 1 животное) с минимальной трудоемкостью прижизненно зарегистрировать и задокументировать в цифровой форме изучаемые процессы и провести взятие материала для морфологиче-

ского анализа органа. Описанные подходы обеспечивают достаточно высокую воспроизводимость результатов (величины коэффициентов вариации изученных функциональных показателей в группах из 7–10 интактных животных не превышают 10–12 %) и позволяют эффективно провести комплексный морфофункциональный анализ исследуемого объекта в условиях эксперимента.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: А. В. П.

Сбор и обработка материала: Т. В. К., Л. И. Е., О. А. Ф.

Статистическая обработка данных: Т. В. К., Ю. А. Л.

Анализ и интерпретация данных: А. В. П., Т. В. К.

Написание текста: А. В. П., Т. В. К., О. А. Ф.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеев Д. С., Попечителей Е. П. Методы исследования двигательной активности мукоцилиарного аппарата // Известия ЮФУ. Технические науки. Тематический выпуск. 2012. С. 189–194 [Alekseev D. S., Popchitelev E. P. Methods of a research of motor activity of the mucociliary system // News of SFU. Technical sciences. Thematic issue. 2012. P. 189–194. In Russ.].
- Кобылянский В. И. Мукоцилиарная система. Фундаментальные и прикладные аспекты. М.: БИНОМ. 2008. 416 с.

- [Kobylyanskiy V.I. The mucociliary system. Fundamental and applied aspects. Moscow: BINOM. 2008. 416 p. In Russ.].
3. Козлов В.С., Крамной А.И., Аверин А.А., Лукашевич Ю.А., Алексеев Д.С. Исследование двигательной активности цилиарного аппарата мерцательного эпителия полости носа *in vitro* // Российская ринология. 2005. № 3. С. 30–33 [Kozlov V.S., Kramnoy A.I., Averin A.A., Lukashovich Yu.A., Alekseev D.S. The study of motor activity of ciliary apparatus of ciliated epithelium of the nasal cavity *in vitro* // Russian rhinology. 2005. № 3. P. 30–33. In Russ.].
 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 [Pavlov A.V., Esev L.I. Methodical approaches to the integrated study of the functional morphology of the epithelial lining of the trachea in the experiment // Morfologiya, 2012. Vol. 142. № 6. P. 73–76. In Russ.].
 5. Bylander A., Nutu M., Wellander R., Goksör M., Billig H., Larsson D.G. Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2010. Vol. 8. P. 48. doi: 10.1186/1477-7827-8-48.
 6. Ezzati M., Djahanbakhch O., Arian S., Carr B.R. Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology. // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014. Vol. 31, № 10. P. 1337–1347. doi: 10.1007/s10815-014-0309-x.
 7. Kölle S., Dubielzig S., Reese S., Wehrend A., König P., Kummer W. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: *ex vivo* analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow // *Biol. Reprod.* 2009. Vol. 81, № 2. P. 267–274. doi: 10.1095/biolreprod.108.073874.
 8. Lyons R.A., Saridogan E., Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia // *Hum. Reprod.* 2006. Vol. 12, № 4. P. 363–372.
 9. Noreikat K., Wolff M., Kummer W., Kölle S. Ciliary activity in the oviduct of cycling, pregnant, and muscarinic receptor knockout mice // *Biol. Reprod.* 2012. Vol. 86, № 4. P. 1–10. doi: 10.1095/biolreprod.111.096339.]
 10. Raidt J., Werner C., Menchen T., Dougherty G.W., Olbrich H., Loges N.T., Schmitz R., Pennekamp P., Omran H. Ciliary function and motor protein composition of human fallopian tubes // *Hum. Reprod.* 2015. Vol. 30, № 12. P. 2871–2880. doi: 10.1093/humrep/dev227.
 11. Shi D., Komatsu K., Uemura T., Fujimori T. Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct // *Genes Cells.* 2011. Vol. 16, № 3. P. 282–290. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01484.x.

Поступила в редакцию 12.11.2017
Получена после доработки 06.03.2018

METHODICAL APPROACHES TO EXPERIMENTAL STUDY OF HISTOPHYSIOLOGY OF MUCOCILIARY TRANSPORT SYSTEM IN THE UTERINE TUBES

A. V. Pavlov¹, T. V. Korablyova¹, L. I. Yesev¹,
O. A. Fokanova¹, Yu. A. Lukashovich²

Objective — to develop the methods for experimental study of the mucociliary system of the uterine tubes based on the use of modern digital technologies.

Materials and methods. Using the complex of histological and specialized “Azimuth” (Russia) hardware-software system, the structural and functional organization of the uterine tubes of small laboratory animals was examined.

Results and Conclusions. The methodical approaches are proposed which allow to carry out the complex morpho-functional analysis including the *in vivo* study of the mucus flow velocity at the level of the organ and in the parietal layer, the parameters of motor activity of the ciliary apparatus, the linear sizes of microscopic objects in combination with the histological examination of the uterine tubes.

Key words: *uterine tubes, epithelial layer, ciliary beat frequency, mucus flow velocity, morphometry*

¹ Department of Histology, Cytology and Embryology, Yaroslavl’ State Medical University, 5 Revolutsionnaya St., Yaroslavl’ 150000; ² Department of Infocommunications and Radiophysics, Faculty of Physics, P. G. Demidov Yaroslavl’ State University, 14 Sovetskaya St., Yaroslavl’ 150003