

© Э. М. Вахитов, И. В. Лабути, А. Н. Козлова, Р. В. Безносик, 2013
УДК 611.814.3+1/-018.82

Э. М. Вахитов, И. В. Лабути, А. Н. Козлова и Р. В. Безносик

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ И РЕСПИРАТОРНОГО ОТДЕЛА ЛЁГКОГО КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ С ПОЗИЦИЙ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНЫХ ГИСТОГЕНЕЗОВ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. А. Стадников), Оренбургская государственная медицинская академия

У 45 белых беспородных крыс-самцов методами световой, электронной микроскопии и иммуногистохимии были исследованы морфофункциональные изменения в лёгких, гипоталамусе и нейрогипофизе через 1, 3, 7, 14 сут после интратрахеального введения штаммов *Staphylococcus aureus*, обладающих антилактоферриновой активностью (АЛФА⁺) и без таковой (АЛФА⁻). При введении бактерий АЛФА⁺ в стенке бронхов и респираторном отделе легких наблюдались деструктивные изменения тканей, явления склероза, нарушение процессов регенерации (полипозные выросты, метаплазия), а в нейрогипофизе происходила задержка высвобождения нейросекрета в кровь на уровне терминалей нонапептидергических нейросекреторных клеток. Описанные признаки не наблюдались при инфицировании бактериями АЛФА⁻. Полученные результаты свидетельствуют о нарушениях структурно-функционального гомеостаза тканей лёгких, связанных с АЛФА бактерий, протекающих при ограничении гипоталамической нейросекреции.

Ключевые слова: лёгкое, воздухоносные пути, респираторный отдел, гипоталамическая нейросекреция

Покровный эпителий воздухоносных путей является одним из важнейших барьеров, стоящих на пути микробной интервенции в организм, что обусловлено продукцией бактерицидного секрета, содержащего лизоцим, лактоферрин и другие факторы защиты [15, 16]. До сих пор малоизученными остаются вопросы взаимодействия микро-организмов, обладающих соответствующим персистентным потенциалом (антилизоцимной, антиинтерфероновой, антилактоферриновой активностями), и тканевых структур лёгких, а также влияния прокариот на репаративные процессы в различных отделах органа [3–6]. Общеизвестно, что гипоталамо-гипофизарный нейроэндокринный комплекс у позвоночных животных играет ведущую роль в интеграции систем организма, поддержании гомеостаза, а также в реализации адаптивных функций [2, 8, 9]. Данный эффект реализуется в условиях различных неблагоприятных воздействий на организм, в том числе и при инфицировании [9, 10]. Однако в силу неоднородности популяции прокариот важно изучить отличительные черты реактивных изменений в гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системе (ГГНС) в зависимости от персистентных характеристик бактерий.

Цель настоящего исследования — проведение морфофункциональной оценки воздухоносных и респираторных отделов лёгких крыс в условиях интратрахеального введения штаммов *Staphylococcus aureus*, обладавших антилактоферриновой активностью (АЛФА⁺) и без таковой (АЛФА⁻), в сопоставлении с соответствующими изменениями в ГГНС.

Материал и методы. Исследование проведено на 45 белых беспородных крысах-самцах массой 210–240 г, которым интратрахеально вводили 2 штамма *S. aureus*: АЛФА⁺ и АЛФА⁻ в дозе 200×10^6 КОЕ в 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия. В опытах использовали музейные штаммы, выделенные в Институте клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН проф. О. Л. Карташовой. Крысы были разделены на 3 группы. Животные 1-й группы (n=15) были инфицированы *S. aureus* с АЛФА⁺, 2-й группы (n=15) — инфицированы штаммом *S. aureus* с АЛФА⁻. Контролем служили крысы, которым интратрахеально вводили 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия (n=15). Материал от экспериментальных и контрольных животных брали на 1-, 3-, 7-, 14-е сутки после введения бактерий/стерильного раствора.

Исследовали кусочки лёгкого, гипоталамуса (включающие супраоптические и паравентрикулярные ядра) и нейрогипофиза. Для светооптического изучения срезы, полученные после стандартной обработки материала, окрашивали гематоксилином Майера — эозином. Нейросекреторный матери-

Сведения об авторах:

Вахитов Эдуард Маратович (e-mail: tripura@mail.ru), Лабути Илья Викторович (e-mail: LabutinIV@yandex.ru), Козлова Алина Николаевна (e-mail: gjstolog32@mail.ru), Безносик Роман Валентинович (e-mail: berova74@rambler.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Оренбургская государственная медицинская академия, 460000, Оренбург, ул. Советская, 6

ал идентифицировали паральдегид-фуксином по Гомори—Габу в модификации А. Л. Поленова [7]. Для электронно-микроскопических исследований материал фиксировали в охлаждённом (4 °С) 2,5% растворе глутаральдегида на S-коллединовом буфере (рН 7,3) с последующей дополнительной фиксацией в 1% растворе четырехокиси осмия по G. Millonig [12]. Затем материал обезвоживали в ацетоне с возрастающей концентрацией и заливали в смесь эпона-812 и аралдита [11]. Полутонкие срезы (толщиной 1 мкм) окрашивали метиленовым синим — основным фуксином по методике T. Sato и M. Shamoto [14]. Ультратонкие срезы (40–60 нм) приготавливали на ультратоме LKB-5 (Bromma, Швеция) с контрастированием в насыщенном спиртовом растворе уранилацетата и цитрате свинца [13]. Срезы просматривали и фотографировали при помощи электронного микроскопа ЭМВ 100АК (Микроскоп, Украина) при увеличении 6000–40 000. Для определения внутриядерной фрагментации ДНК использовали набор реактивов «ApopTag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit» (Integrin, Канада) с докрасиванием ядер клеток 0,5% раствором метиленового зеленого на 0,1 М ацетатном буфере.

Дегранулированные и заполненные секреторными гранулами нонапептидергические терминали подсчитывали в случайных полях зрения с помощью окулярной сетки Г. Г. Автандилова (256 квадратов) [1] при об. 40, ок. 10 (МБИ-15). Полученные цифровые данные обрабатывали статистически при помощи пакета программ «Statistica 5.5 for Windows» и программного пакета «MS Excel 2003». Значимость различий сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента. Различия между средними величинами считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. В случае инфицирования крыс микробным штаммом АЛФА[–] в течение первых 3 сут в слизистой оболочке бронхов среднего и мелкого калибра развивался воспалительный процесс с преобладанием инфильтративно-экссудативных изменений. Незначительные альтеративные изменения проявлялись деструкцией эпителиоцитов, которые слущивались с небольших участков и оказывались в просвете бронхов, где также наблюдалось скопление слизи и лейкоцитов.

Изменения в бронхиальном эпителии характеризовались выраженной гиперплазией бокаловидных клеток, что свидетельствовало об усилении мукоидно-секреторных процессов, которые нарастали к 7-м суткам. При этом появлялись полипозные выросты в просвет мелких бронхов, что могло приводить к их обструкции. Описанные изменения в стенках бронхов имели, как правило, мозаичный характер. Их интенсивность возрастала по мере уменьшения диаметра бронхов.

На 2-й неделе эксперимента на фоне локальных деструктивных процессов в соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки бронхов среднего калибра развивалась грануляционная ткань с обилием вновь образованных сосудов микроциркуляторного русла.

В условиях интратрахеального введения *S. aureus* АЛФА⁺ в первые 3 сут наблюдалось, как и в ранее описанной серии опытов, усиление секреции бокаловидных клеток.

В стенке бронхов среднего калибра развивались отёк, плазморрагия, геморрагии, значительно возрастало число лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов, гранулоцитов, тучных клеток. Воспалительные изменения локализовались в основном в подэпителиальной зоне, вокруг конечных отделов и выводных протоков бронхиальных желёз. Инфильтраты, весьма крупных размеров содержали лимфоциты, а также единичные эозинофилы, полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги.

На 2-й неделе опыта в собственной пластинке слизистой оболочки возрастало число коллагеновых волокон с формированием зон гиалиноза. Отдельные сосуды микроциркуляторного русла имели утолщенные стенки с признаками периваскулярного отёка и склероза. Среди бокаловидных экзокриноцитов обнаруживались клетки, содержащие большое количество лизо- и аутофагосом.

К 14-м суткам была отмечена метапластическая перестройка эпителиального пласта. Были обнаружены отдельные участки слизистой оболочки бронхов, покрытые многослойным плоским эпителием (рис. 1).

По мере прогрессирования воспалительного процесса в стенке внутрилёгочных бронхов, в их просвете накапливалось значительное количество слизистого и/или слизисто-гнойного содержимого, что усугубляло обструкцию мелких бронхов.

У инфицированных крыс на ранних стадиях эксперимента (1–3-и сутки) при светооптическом исследовании в обеих сериях опытов наблюдались явления прогрессирующей инфильтрации легочных альвеол нейтрофилами, лимфоцитами, эозинофилами, плазматическими клетками. Были выявлены признаки разрушения и фрагментации межальвеолярных перегородок. До 3-х суток эксперимента при инфицировании АЛФА[–] пневмоцитами I типа, сохраняющими свои межклеточные контакты, удерживалась экстравазация плазмы и форменных элементов крови в просвет альвеол. При инфицировании персистентным штаммом бактерий (АЛФА⁺) данный эффект не наблюдался. При этом отмечались явления дистрофии и некробиоза пневмоцитов (рис. 2), что и усугубляло развитие экссудативного процесса.

Некроз пневмоцитов I типа был наиболее выражен в сочетании с фибринозным выпотом в полость альвеол. В этих же зонах легкого наблюдались явления васкулита с тромбозом сосудов

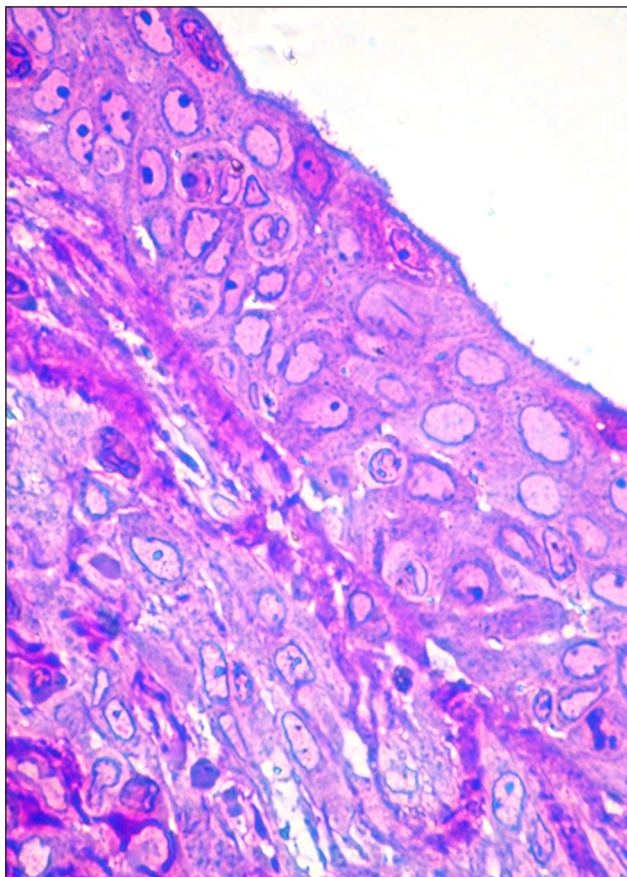


Рис. 1. Фрагмент стенки бронха среднего калибра через 14 сут после интратрахеального введения *S. aureus* АЛФА⁺.

Структурная реорганизация эпителия слизистой оболочки бронха по типу метаплазии. Полутонкий срез. Окраска по T. Sato и M. Shamoto [14]. Об. 40, ок. 10

микроциркуляторного русла, развитием геморрагических инфарктов. На стадии 14 сут было отмечено разрастание соединительной ткани в области аэрогематического барьера, что приводило к очаговому склерозу в участках воспаления.

К 7-м суткам нарастали явления альтерации в терминальных бронхиолах, которые были заполнены фибрином и дегенерирующими лейкоцитами. По периферии зон некроза располагались детритные массы с микроорганизмами, где нередко возникали микроабсцессы.

Обнаружено также, что при прямом контакте с *S. aureus* АЛФА⁺ клеточные элементы легочных

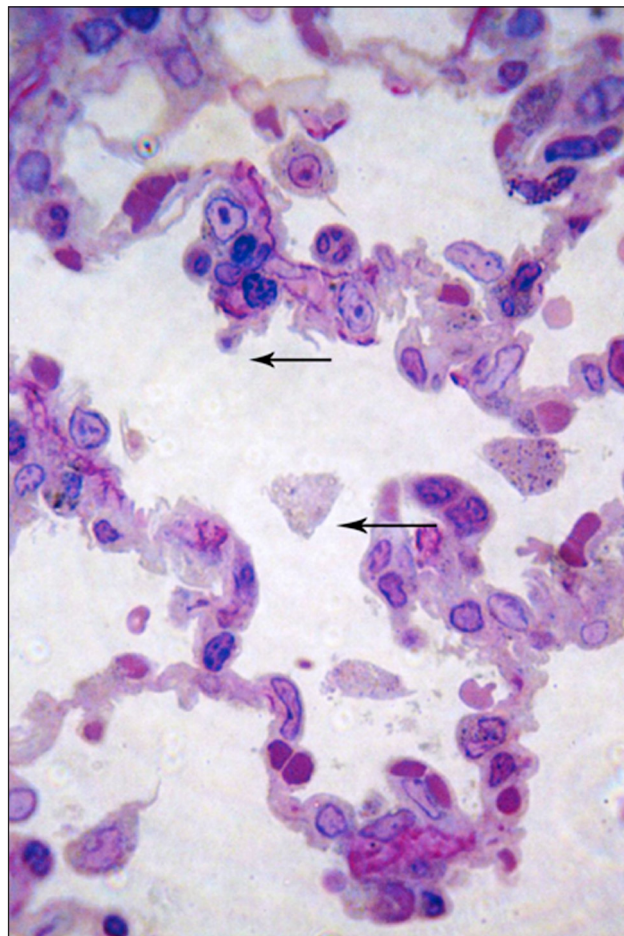


Рис. 2. Легочная альвеола крысы через 3 сут после инфицирования *S. aureus* АЛФА⁺.

Стрелки — деструктивно измененные пневмоциты. Полутонкий срез. Окраска по T. Sato и M. Shamoto [14]. Об. 40, ок. 10

альвеол имели ультраструктурные и иммуноцитохимические изменения. Число клеток с апоптотной доминантой было значительно больше в случае инфицирования бактериями АЛФА⁺, чем микробами, не обладающими этой активностью. Данная закономерность была прослежена по показателям деградации ДНК, установленной TUNEL-методом (табл. 1).

При изучении крупноклеточных ядер гипоталамуса у крыс, подвергнутых интратрахеальному введению бактерий АЛФА⁺ были идентифицированы функционально активные нейросекреторные клетки (НСК), имеющие крупные ядра и ядрыш-

Таблица 1

Доля Аортtag-позитивных клеток ацинусов легких у контрольных крыс и через 7 сут инфицирования *S. aureus* АЛФА⁻ и АЛФА⁺ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Клетки ацинусов	Группа животных		
	контрольная	инфицированная <i>S. aureus</i> АЛФА ⁻	инфицированная <i>S. aureus</i> АЛФА ⁺
Стромальные	0,4±0,010	3,70±0,020	5,50±0,010*
Пневмоциты	0,20±0,010	2,90±0,020	4,80±0,010*

* Различия между группами значимы при $P \leq 0,05$.

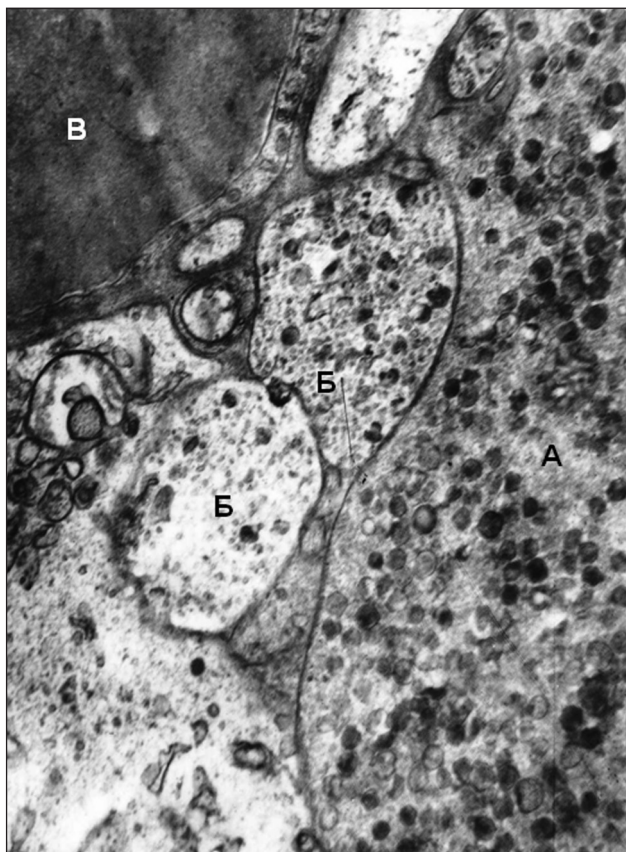


Рис. 3. Участок нейрогипофиза крысы через 3 сут после интратрахеального введения *S. aureus* АЛФА⁺.

А — терминаль пептидергической нейросекреторной клетки (переполнена секреторными гранулами); Б — моноаминергические нервные волокна; В — гемокапилляр. Ув. 21 6000

ки, а на уровне аксовазальных контактов в нейрогипофизе обнаружены «пустые» пузырьки, что указывает на активизацию как процессов синтеза, так и экстрюзии секреторных гранул в общую гемокциркуляцию.

В аналогичных условиях инфицирования крыс бактериями АЛФА⁺, начиная с 7-х суток эксперимента, было выявлено существенное возрастание количества нонапептидергических терминалей НСК, переполненных секреторными гранулами,

что демонстрирует феномен задержки высвобождения нейросекрета в микроциркуляторное русло нейрогипофиза (рис. 3, табл. 2).

У данных животных в гипоталамусе нередко определялись периваскулярно расположенные полиморфно-клеточные инфильтраты. В структуре супраоптических и паравентрикулярных ядер часто встречались НСК с признаками кариопикноза.

Обсуждение полученных данных. К настоящему времени сформулировано положение о том, что морфологические проявления взаимодействий про- и эукариот в основном определяются двумя факторами — уровнем адаптивной активности нонапептидергической ГГНС и персистентным потенциалом микроорганизмов [3, 9]. Наши результаты по изучению ГГНС показали, что в условиях воздействия на организм экспериментальных животных бактерий с высоким персистентным потенциалом (по сравнению с инфицированием АЛФА⁻) происходит рассинхронизация секреторного цикла нонапептидергических НСК. Суть такого процесса состоит в том, что усиленная продукция нейропептидов не сопровождается адекватной их экстрюзией в аксовазальный комплекс.

Основываясь на наших наблюдениях, мы можем сделать заключение о том, что блокировка высвобождения нейросекрета на уровне терминалей нонапептидергических аксонов, наблюдаемая при интратрахеальном введении стафилококка АЛФА⁺, может привести к дефициту циркулирующих нейрогормонов. Это, в свою очередь, лимитирует реализацию тканями воздухоносных путей и респираторных отделов лёгких своих гистологических и органотипических потенциалов. Так, в условиях интратрахеального введения *S. aureus* АЛФА⁺ во внутрилёгочных бронхах наблюдались деструктивные изменения эпителиоцитов, массивные инфильтраты с формированием склеротических изменений в подэпителиальной соединительной

Таблица 2

Количество дегранулированных и заполненных секреторными гранулами нонапептидергических терминалей в срединном возмущении гипоталамуса у контрольных крыс и в различные сроки после инфицирования *S. aureus* АЛФА⁻ и АЛФА⁺ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Объект исследования	Группы животных				
	контрольная	инфицированная <i>S. aureus</i> АЛФА ⁻		инфицированная <i>S. aureus</i> АЛФА ⁺	
		3 сут	5 сут	3 сут	5 сут
Дегранулированные нонапептидергические терминали	58,2±2,1	64±3*	67,9±1,8*	52,4±2,1*	47,6±2,2*
Нонапептидергические терминали, заполненные секреторными гранулами	41,8±2,7	35,9±1,8*	32,1±1,7*	47,6±2,7*	52,4±1,7*

* Различия по сравнению с контролем значимы при $P \leq 0,05$.

ткани, трансформация эпителия в многослойный плоский и появление полиповидных выростов. В этой связи наши данные согласуются с результатами изучения эпителия воздухоносных путей у крыс, инфицированных *E. coli*, на фоне длительного эмоционально-болевого стресса [5] и подтверждают концепцию об адаптивной роли нонапептидов ГНС при воздействиях на организм дестабилизирующих факторов [8].

Известно, что благодаря внутригеномным комбинационным преобразованиям микробы приобрели способность изменять свои свойства и противостоять защитным реакциям макроорганизма, вызывая структурно-функциональную реорганизацию их клеток и тканей на грани срыва адаптации и патоморфологических изменений [3, 4]. Наши данные на примере воздухоносных и респираторных отделов лёгких у крыс, инфицированных стафилококком *ALFA*⁺, подтвердили это положение. Таким образом, мы делаем вывод о том, что диапазон гисто- и органотипических возможностей реснитчатых эпителиоцитов и пневмоцитов зависит не только от функциональных особенностей и фило-эмбриогенетических закономерностей, но и от коррелятивных связей с интерстициальными клеточными элементами органа, подчиненных, в свою очередь, интегрирующим нейроэндокринным факторам организма [3, 5, 8, 9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. М., Медицина, 1990.
2. Акмаев И. Г. и Гриневич В. В. Нейроиммуноэндокринология гипоталамуса. М., Медицина, 2003.
3. Бухарин О. В. Персистенция патогенных бактерий. М., Медицина, 1999.
4. Валышев А. В. и Валышева И. В. Роль антилактоферриновой активности бактерий в их персистенции. Журн. микробиол., 2006, № 4, с. 23–25.
5. Козлова А. Н. Изменение эпителия воздухоносных путей у крыс, инфицированных на фоне длительного эмоционально-болевого стресса, и влияние на них окситоцина. Морфология, 2008, т. 134, вып. 5, с. 33–36.
6. Мещеряков К. Н. и Лабути И. В. Реактивность и пластичность эпителиев воздухоносных путей и лёгочных ацинусов крыс в экспериментальных условиях. Медицинская наука и образование Урала, 2008, т. 9, № 4, с. 92–94.
7. Поленов А. Л. Эволюция гипоталамо-гипофизарного нейроэндокринного комплекса. Эволюционная физиология. Л., Наука, 1983, ч. 2, с. 53–109.
8. Поленов А. Л., Константинова М. С. и Гаврилов П. Е. Гипоталамо-гипофизарный нейроэндокринный комплекс. В кн.: Нейроэндокринология, СПб., Наука, 1994, ч. 2, с. 139–186.
9. Стадников А. А. Роль гипоталамических нейропептидов во взаимодействиях про- и эукариот. Структурно-функциональные аспекты. Екатеринбург, Изд-во УрО РАН, 2001.
10. Стадников А. А. Гипоталамическая нонапептидергическая регуляция клеточного и тканевого гомеостаза взаимодействий про- и эукариот. Морфология, 2008, т. 134, вып. 5, с. 14–19.
11. Colloidal Gold: Principles. Methods and Applications. M. A. Hayat (Ed.). v. 1. San Diego CA, Academic Press, 1989.
12. Millonig G. A. Advantages of a phosphate buffer for osmium-tetroxide solutions in fixation. J. Appl. Physics, 1961, v. 32, p. 1637–1643.
13. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 1963, v. 17, p. 208–212.
14. Sato T. and Shamoto M. A simple rapid polychrome stain for epoxy-embedded tissue. Stain Technol., 1973, v. 48, p. 223.
15. Tam A., Wadsworth S., Dorscheid D. et al. The airway epithelium: more than just a structural barrier. Ther. Adv Resp. Dis., 2011, v. 12, № 3, p. 122–126.
16. Weinberg E. D. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. J. Pharm. Pharmacol., 2001, v. 53, № 10, p. 1303–1310.

Поступила в редакцию 05.02.2013
Поступила после доработки 11.04.2013

MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CONDUCTING AIRWAYS AND THE RESPIRATORY PORTION OF RAT LUNG UNDER THE CONDITIONS OF INTRATRACHEAL INFECTION FROM THE POSITIONS OF THE NEUROENDOCRINE REGULATION OF REPARATIVE HISTOGENESES

E. M. Vakhitov, I. V. Labutin, A. N. Kozlova and R. V. Beznosik

With the use of light and electron microscopy and immunohistochemistry, the morpho-functional changes in the lungs, the hypothalamus and the neurohypophysis were studied in 45 outbred albino male rats 1, 3, 7 and 14 days after the intratracheal infusion of *Staphylococcus aureus* strains either possessing anti-lactoferrin activity (*ALFA*⁺) or lacking it (*ALFA*[−]). After the infusion of *ALFA*⁺ bacteria, the bronchial wall and the respiratory portion of the lungs demonstrated the destructive changes of tissues, sclerosis phenomena, disturbances of regeneration processes (polypoid outgrowth, metaplasia), while in the neurohypophysis a delay in the release of neurosecretion into the blood from the terminals of nonapeptidergic neurosecretory cells took place. These phenomena were not observed after the infection with *ALFA*[−] bacteria. The results obtained indicate the disturbances of the structural-functional homeostasis of pulmonary tissues associated with bacterial *ALFA*, taking place together with the limitations of the hypothalamic neurosecretion.

Key words: lung, conducting airways, respiratory portions, hypothalamic neurosecretion

Department of Histology, Cytology, and Embryology, Orenburg State Medical Academy