

© А. В. Павлов, Л. И. Есев, 2012
УДК 611.231.018.25:001.8

А. В. Павлов и Л. И. Есев

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К КОМПЛЕКСНОМУ ИЗУЧЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МОРФОЛОГИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ТРАХЕИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. В. Павлов), Ярославская государственная медицинская академия

Описан алгоритм функционального и морфологического анализа трахеи мелких лабораторных животных, включающий последовательное изучение скорости движения слизи *in vivo* и двигательной активности ресничного аппарата *in vitro* в сочетании с гистологическим исследованием органа. Предлагаемые методические подходы позволяют за короткий период времени (20–30 мин в расчете на одно животное) прижизненно зарегистрировать и задокументировать в цифровой форме видеофайлы с их последующей визуальной оценкой и математическим анализом изучаемых параметров. Данные методики обеспечивают высокую воспроизводимость результатов и позволяют с максимальной эффективностью и информативностью провести комплексный морфофункциональный анализ исследуемого объекта.

Ключевые слова: трахея, мукоцилиарный транспорт, реснитчатый эпителий, биение ресничек

В основе мукоцилиарного транспорта (МЦТ) — важнейшей защитной функции слизистой оболочки воздухоносных путей — лежит эффективная работа ресничного аппарата многоядного реснитчатого эпителия, погруженного в жидкий перилимфарный слой и перемещающего за счет биения ресничек более вязкий поверхностный слой слизи, между этими слоями расположен тонкий слой сурфактанта [4, 11]. Большинство предложенных различными авторами методических подходов к изучению МЦТ и двигательной активности ресничного аппарата (ДАРА) разработаны для клинической диагностики [4, 5, 7, 9, 12]. Вопросы адаптации данных методик к экспериментальным исследованиям на лабораторных животных в литературе освещены менее подробно [3, 8]; лишь в единичных публикациях приведены результаты сочетанного изучения показателей МЦТ, ДАРА и микроскопической структуры эпителиального пласта [6]. Поэтому выбор эффективного и информативного алгоритма исследования структурных и функциональных параметров эпителиальной выстилки воздухоносных путей у одних и тех же экспериментальных животных с использованием современной цифровой техники и программного обеспечения продолжает оставаться актуальной задачей.

На кафедре гистологии Ярославской государственной медицинской академии разработан алгоритм комплексного функционального и морфологического анализа трахеи мелких лабораторных

животных (белые крысы Вистар), включающий последовательную оценку скорости движения слизи *in vivo* и ДАРА *in vitro* в сочетании с гистологическим исследованием слизистой оболочки воздухоносных путей (рис. 1). Используемые методики прижизненного исследования включают создание и сохранение оцифрованных видеофайлов с их последующей визуальной оценкой и математическим анализом изучаемых параметров.

1. Исследование скорости движения слизи *in vivo*.

Организация эксперимента. Использована модифицированная методика измерения скорости МЦТ у лягушек, основанная на регистрации перемещения инертного маркера по поверхности слизистой оболочки [2]. Общий вид используемой системы наблюдения и регистрации представлен на рис. 2, а. Наркотизированное животное (уретановый наркоз, 1000 мг/кг, внутривенно) фиксируют на специальном термостолке (32 °С). После послойного обнажения трахеи на вентральной поверхности последней производят разрез скальпелем (см. рис. 1, а) таким образом, чтобы после удаления участка стенки в области надреза получился участок трахеи длиной 8–10 мм в виде полуоткрытой трубочки (см. рис. 1, б).

На раскрытые края трахеи накладывают высушенное покровное стекло с нанесенной шкалой (шаг деления — 0,1 мм), предварительно обработанное антифоном (противозапотевающей жидкостью), что обеспечивает герметизацию тра-

Сведения об авторах:

Павлов Алексей Владимирович (e-mail: pavlov@yma.ac.ru), Есев Леонид Иванович, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Ярославская государственная медицинская академия, 150000 Ярославль, ул. Революционная, 5

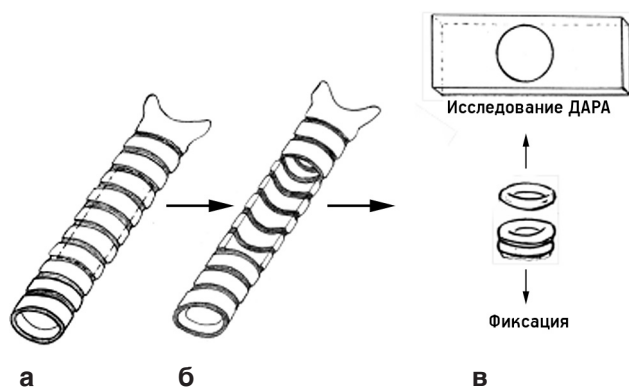


Рис. 1. Этапы (стрелки) проведения комплексного функционального и морфологического анализа трахеи мелких лабораторных животных.

а, б — исследование скорости движения слизи *in vivo*, пунктиром обозначены линии надреза трахеи; в — выделение колец трахеи из смежных с надрезом участков для изучения двигательной активности ресничного аппарата (ДАРА) и гистологического исследования

хеи и сохранение эффективных дыхательных движений, препятствует высыханию слизистой оболочки и позволяет осуществлять замеры (см. рис. 2, б). Трахею орошают подогретым до $32 \pm 0,5$ °C раствором — средой Игла МЕМ с L-глутамином (производитель — предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, Москва). В качестве инертного маркера используют мелкоизмельченные частицы активированного угля, предварительно смешанные с подогретой средой. Шейную часть наркотизированного животного помещают под объектив бинокулярного стереомикроскопа МБС-1 (ЛОМО, СССР) с боковым освещением, в один из окуляров которого помещена цифровая камера WEBBERS Myscope 200M CCD (Webbers, КНР) с выводом данных на монитор компьютера; общее увеличение оптической системы 10.

Создание видеофайла. На нижний край обнаженной слизистой оболочки трахеи помещают

маркер, под контролем на экране монитора компьютера производят видеозахват сфокусированного изображения (см. рис. 2, в) с частотой 25 кадров/с с последующим сохранением видеофайла (продолжительность записи одного фрагмента составляет 3–5 мин).

Общая продолжительность выполнения данного этапа — до 10–12 мин в расчете на 1 животное (без учета времени введения в наркоз).

Математическая обработка. Во время изучения видеофайла программа видеосъемки Scorephoto 3.0.12.781 позволяет одновременно с изображением выводить на экран цифровой таймер с точностью до сотых долей секунды. На основании этого, рассчитывается скорость прохождения частицами маркера участка трахеи длиной 5–7 мм.

2. Исследование ДАРА *in vitro*, взятие материала для гистологического исследования.

Организация эксперимента. В основу предлагаемых подходов к исследованию ДАРА в эксперименте на белых крысах

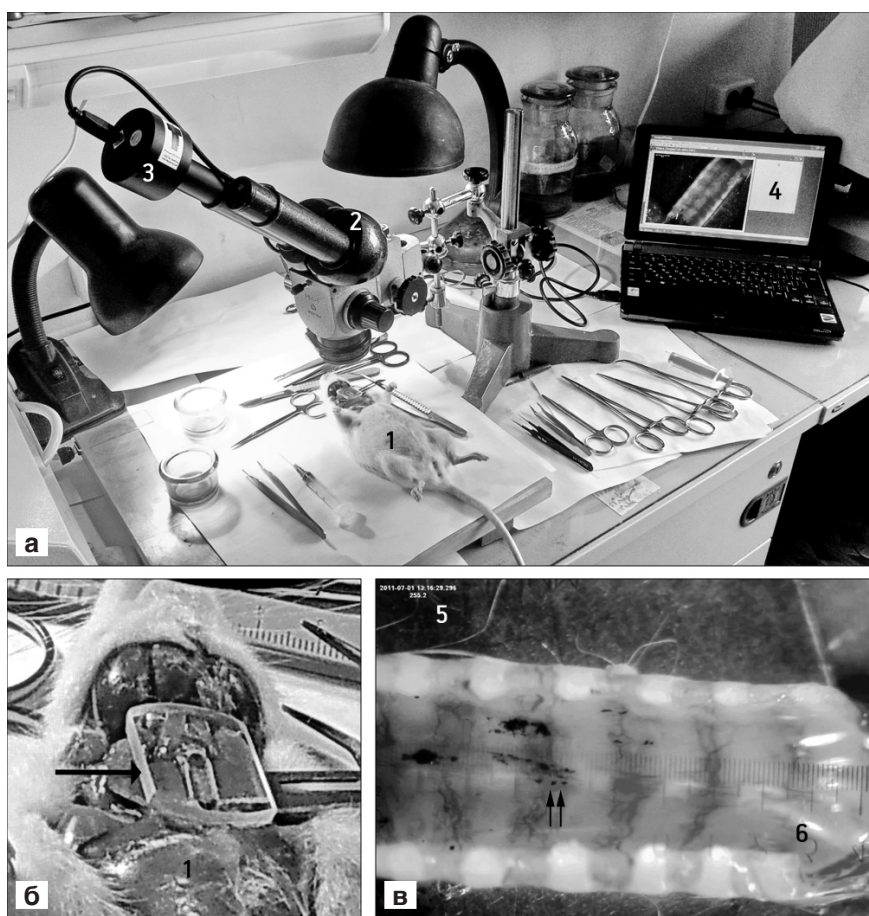


Рис. 2. Исследование скорости движения слизи *in vivo*.

а, б — система наблюдения и регистрации скорости движения слизи; в — начальный фрейм видеофайла. 1 — наркотизированное животное; 2 — бинокулярный стереомикроскоп; 3 — цифровая камера; 4 — компьютер; 5 — цифровой таймер; 6 — шкала; стрелка — покровное стекло с делениями; две стрелки — маркер (частицы угольной пыли)

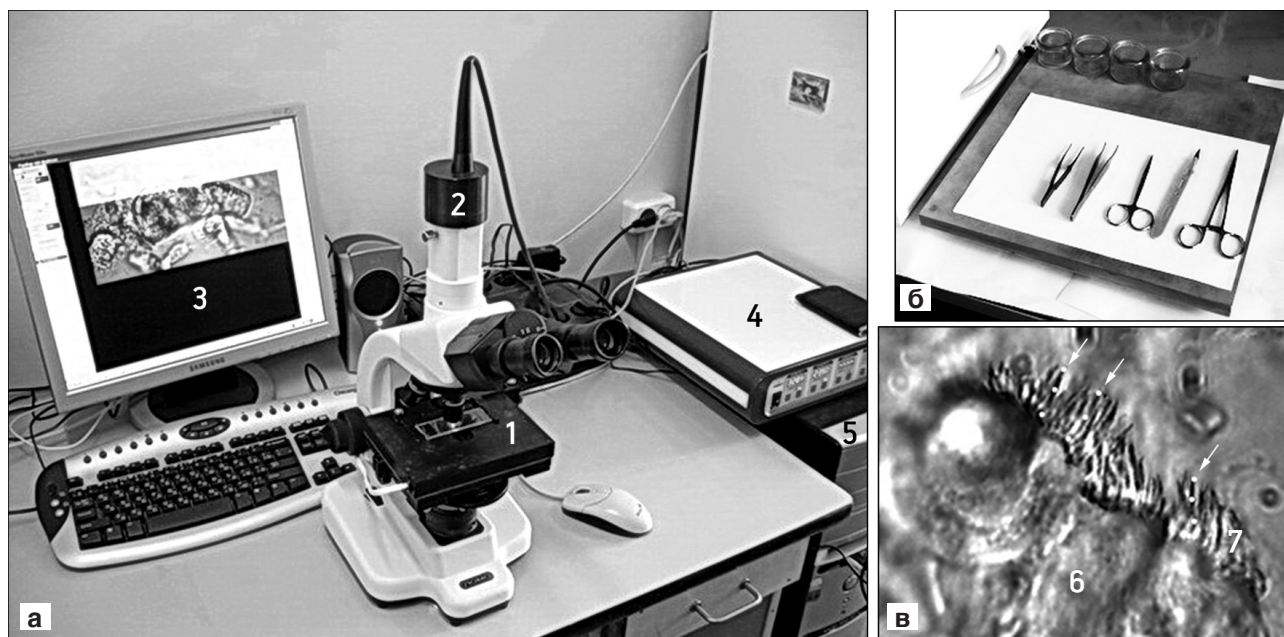


Рис. 3. Исследование двигательной активности ресничного аппарата (ДАРА) трахеи in vitro.

а — система наблюдения и регистрации ДАРА; б — термостол для подготовки инструментов и растворов с питательной средой; в — фрейм видеофайла. 1 — термостол микроскопа; 2 — скоростная видеокамера; 3 — монитор для вывода изображения; 4 — блок терморегуляции; 5 — системный блок компьютера; 6 — мерцательные клетки; 7 — мерцательные реснички; кружки — идентификационные точки, нанесенные на ресничку (стрелки)

положена методика прямой видеорегистрации, применяемая для изучения биоптатов эпителия носовой полости у человека [1, 10, 11]. Для проведения исследований использован программно-аппаратный комплекс (НПО Азимут, Россия), включающий в себя микроскоп Микмед-6 (ЛОМО, СССР) с термостолком, высокочастотную аналоговую видеокамеру Эндокам-600К, компьютер с платой захвата высокочастотного видеосигнала Raster RT851 и специальное программное обеспечение MOSFRO для измерения частоты движения колеблющихся объектов (рис. 3, а). Электронный блок термостатирования обеспечивает регулировку и поддержание стабильной температуры $32 \pm 0,5$ °C как биоптата в процессе микроскопии (термостол микроскопа), так и инструментария, предметных и покровных стекол, сосудов с питательной средой [отдельный термостатируемый стол (см. рис. 3, б)]. Использование высокочастотных камеры и платы видеозахвата позволяет проводить черно-белую запись изображения с частотой до 80 кадров/с.

Создание видеофайла. После завершения съемки движения слизи по открытому фрагменту трахеи производят взятие поперечного среза кольца трахеи толщиной до 1 мм, смежного с открытым участком (см. рис. 1, в) и помещают его в лункообразное углубление предметного стекла, заполненное средой Игла МЕМ и предварительно нагретого на термостолке до 32 °C. Остальную

часть трахеи помещают в фиксирующую среду (забуференный формалин, жидкость Буэна) для последующего гистологического и гистохимического изучения (см. рис. 1, г).

Биоптат накрывают тонким покровным стеклом и помещают под микроскоп (об. 100 — масляная иммерсия), после чего производится поиск зоны с четкой видимостью движущихся ресничек реснитчатого эпителия. Изображение воспроизводится на мониторе компьютера в режиме реального времени. После нахождения одной из зон объекта при суммарном увеличении 1000 (об. 100, ок. 10) осуществляют захват сфокусированного изображения с последующим сохранением видеофайла (продолжительность записи одного фрагмента составляет 10–12 с). С одного образца записывают не менее трех видеофайлов. Общая продолжительность данного этапа — до 10–15 мин в расчете на 1 животное.

Математическая обработка. Подсчет частоты движения ресничек проводится при помощи специальной компьютерной программы MOSFRO. Последняя позволяет воспроизводить всю запись, проводить покадровый просмотр, произвести подсчет частоты колебаний, а также рассчитать соотношение фаз мерцания ресничек, представленных в видеофрагменте. Для выполнения подсчета частоты колебаний ресничек и фаз их движения на монитор выводят начальный фрейм изучаемого видеофрагмента. На мониторе четко визуализиру-

ются реснички эпителия, на которые при помощи компьютерной мыши наносят идентификационные точки (см. рис. 3, в). После запуска видео-файла программа фиксирует изменение яркости в этих точках и рассчитывает частоту колебаний объектов (в Гц). Кроме того, при нанесении точек на основание и конец реснички автоматически рассчитывается высота последней. Все полученные результаты сохраняются в электронной базе данных, что позволяет наблюдать динамику изменения характеристик объектов и проводить статистический анализ.

Предлагаемый алгоритм изучения гистологии эпителиальной выстилки трахеи позволяет за короткий период времени (20–30 мин в расчете на одно животное) прижизненно зарегистрировать и задокументировать в цифровой форме изученные процессы и провести взятие материала для гистологического анализа стенки органа. Данная продолжительность эксперимента не влияет на изменение показателей МЦТ и ДАРА, что предварительно установлено в процессе отработки методик. Описанные подходы обеспечивают достаточно высокую воспроизводимость результатов (величины коэффициентов вариации изученных функциональных показателей в возрастных группах из 7–10 интактных животных не превышают 10–12%) и позволяют с максимальной эффективностью и информативностью провести комплексный морфофункциональный анализ исследуемого объекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крамной А. И. Двигательная активность цилиарного аппарата полости носа у человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2008.
2. Марков Г. И. Исследование лекарственных средств на двигательную активность мерцательного эпителия в эксперименте. Вестн. оторинолар., 1976, № 6, с. 13–14.
3. Марков Г. И., Марков М. Г. и Жуков С. К. Методика исследования транспортной функции мерцательного эпителия слизистой оболочки полости носа у теплокровных животных. Вестн. оторинолар., 1996, № 1, с. 35.
4. Рихельманн Г. и Лопатин А. С. Мукоцилиарный транспорт: экспериментальная и клиническая оценка. Российская ринология, 1994, № 4, с. 33–47.
5. Шабалин В. В. Двигательная активность ресничек мерцательного эпителия при нарушении мукоцилиарного транспорта у человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2002.
6. 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. Molec. Physiol., 2009, v. 296, № 6, p. 1067–1075.
7. Jorissen M., Willems T. and De Boeck K. Diagnostic evaluation of mucociliary transport: from symptoms to coordinated ciliary activity after ciliogenesis in culture. Am. J. Rhinol., 2000, v. 14, № 5, p. 345–352.
8. King M. Experimental models for studying mucociliary clearance. Eur. Respir. J., 1998, v. 11, № 1, p. 222–228.
9. Ostrowski L. E., Dutcher S. K. and Lo C. W. Cilia and models for studying structure and function. Proc. Am. Thorac. Soc., 2011, v. 8, № 5, p. 423–429.
10. Riechelmann H., Kienast K., Schellenberg J. and Mann W. J. An in vitro model to study effects of airborne pollutants on human mucociliary activity. Rhinology, 1994, v. 32, № 3, p. 105–108.
11. Rubin B. K. Physiology of airway mucus clearance. Respir. Care, 2002, v. 47, № 7, p. 761–768.
12. Trindade S. H., de Mello J. F., Mion Ode G. et al. Methods for studying mucociliary transport. Braz. J. Otorhinol., 2007, v. 73, № 5, p. 704–712.

Поступила в редакцию 18.06.2012

METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE COMPLEX STUDY OF THE FUNCTIONAL MORPHOLOGY OF THE TRACHEAL EPITHELIAL LINING IN THE EXPERIMENT

A. V. Pavlov and L. I. Yesev

An algorithm is described for the functional and morphological analysis of the trachea in small laboratory animals, including the consecutive in vivo study of the velocity of mucus movement and in vitro analysis of motor activity of the ciliary apparatus in combination with the histological study of the organ. The proposed methodological approaches permits, during a short period of time (20–30 min per one animal) to supravitaly register and document in digital format video files with their subsequent visual estimation and mathematical analysis of the parameters studied. These techniques provide high reproducibility of the results with a maximum efficiency and information value and permit to undertake a comprehensive morpho-functional analysis of the investigated object.

Key words: *trachea, mucociliary transport, ciliated epithelium, ciliary beat*

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