

С. С. Целуйко, М. М. Горбунов, В. С. Намаконова, Н. П. Красавина

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТРАХЕИ ПРИ ОБЩЕМ ОХЛАЖДЕНИИ ОРГАНИЗМА

*Амурская государственная медицинская академия,
675000, ул. Горького 95, тел./факс 8-(4162)-31-90-07, г. Благовещенск*

Резюме

С помощью маркера – щелочная фосфомоноэстераза, выявлены стволовые клетки (базальные) в эпителии слизистой оболочки трахеи. Установлено участие стволовых клеток в процессе регенерации при действии на организм низких температур и показано усиление регенерационного процесса в эпителии на фоне применения природных антиоксидантов – дигидрокверцетина и арабиногалактана. Данные морфологического и морфометрического исследований доказывают целесообразность использования данных препаратов с целью коррекции регенерационного потенциала эпителия слизистой оболочки трахеи при действии на организм низких температур.

Ключевые слова: стволовая клетка, базальная клетка, эпителий слизистой оболочки, регенерация эпителия, щелочная фосфомоноэстераза, дигидрокверцетин, арабиногалактан.

S. S. Tseluyko, M. M. Gorbunov, V. S. Namakonova, N. P. Krasavina

EFFECT OF NATURAL ANTIOXIDANTS EPITHELIUM RECONSTRUCTION TRACHEAL MUCOSA AT THE GENERAL COOLING OF THE BODY

Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk

Summary

Using marker – alkaline phosphomonoesterase, identified stem cells (basal) in the epithelium of the tracheal mucosa. Established part of stem cells in the regeneration process when exposed to low temperatures and the body shows increased regeneration process in the epithelium on the background of natural antioxidants – dihydroquercetin and arabinogalactan. These morphological and morphometric studies demonstrate the feasibility of using these drugs in order to correct the regeneration potential of the mucosal epithelium of the trachea in effect on an organism of low temperatures.

Key words: stem cell, basal cell, mucosal epithelium, epithelial regeneration, alkaline phosphomonoesterase, dihydroquercetin, arabinogalactan.

Неблагоприятные факторы воздушной среды достаточно часто оказывают отрицательное влияние на воздухоносные пути, особенно это проявляется при длительном пребывании организма в условиях низкой температуры [3, 12]. При воздействии на организм холодового фактора в первую очередь мобилизуются защитно-компенсаторные процессы на субклеточном и клеточном уровнях. Действие низких температур приводит к активации реакции перекисного окисления липидов, что является одним из факторов приводящим к нарушению процесса регенерации [2, 5, 7].

Известно, что почти каждая ткань в организме имеет запас стволовых клеток, которые пополняют ее клеточный состав, постоянно уменьшающийся в ходе функциональных перегрузок или болезней [8, 10, 13]. При повреждении образуются клеточные факторы роста, которые регулируют пролиферацию и дифференцировку клеток в организме и способствуют восстановлению структур [4, 9, 14]. В климатических условиях Крайнего Севера хронические заболевания легких характеризуются затяжным течением, и часто сопровождаются обострениями, в связи с чем становится очевидной необходимость индивидуализации лечения и подбор средств профилактики. Поэтому одно из ведущих мест занимает вопрос применения препаратов природного происхождения, позволяющих

снизить уровень негативного влияния низких температур на организм. В частности, в древесине и коре лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина содержится значительное количество дигидрокверцетина и арабиногалактана, обладающих выраженной антиоксидантной активностью [6].

Целью данной работы является изучение регенерационного потенциала эпителия слизистой оболочки трахеи у животных (крысы) на фоне воздействия низких температур и применение в ходе эксперимента с целью коррекции природных антиоксидантов.

Материалы и методы

Исследование проведено на 70 белых беспородных половозрелых крысах-самцах с массой тела 150–200 г. При исследовании животные были разбиты на следующие группы: первая контрольная состояла из 15 животных, которые содержались в условиях вивария в течение всего эксперимента при t 22° С. Вторая группа, состоящая из 20 животных, подвергалась общему холодовому воздействию в течение 28 дней при t 15° С. В третью группу входили 18 животных, которым в течение двух недель, предшествующих охлаждению перорально вводили дигидрокверцетин (ДКВ) из расчета 5мг/100 г. Затем их подвергали общему холодовому воздействию в течение 28 дней по 3 часа ежедневно при t 15° С на фоне перорального введения препарата.

Четвертая группа состояла из 17 животных, которым в течение двух недель, предшествующих охлаждению перорально вводили арабиногалактан из расчета 5 мг/100 г. Затем животных подвергали общему воздействию низких температур в течение 28 дней по 3 часа ежедневно при $t 15^{\circ} \text{C}$ на фоне перорального введения препарата.

Объектом нашего исследования были краниальные и каудальные отделы слизистых оболочек трахеи крыс. Взятые образцы тканей использовали для изготовления полутонких и ультратонких срезов. Для этого из краниального и каудального отдела трахеи вырезали кусочки ткани размером 1×1 мм. Материал фиксировался 1 час в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Затем образцы ткани помещали в 1% раствор осмиевой кислоты на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) на 1,5 часа. Обезвоживание материала осуществлялось в спиртах восходящей концентрации: 50%, 60%, 70%, 80%, 96% по 10 минут и в двух сменах абсолютного спирта по 10 минут. После проводки образцы ткани заливали в смесь эпона и аралдита. Полимеризация проводилась при температуре $+60^{\circ} \text{C}$ на протяжении 72 часов [1]. Из полученного материала изготавливали полутонкие срезы, которые окрашивали метиленовым синим. С целью изучения локализации и активности щелочной фосфоноэстеразы применяли метод электронной гистохимии по Майяхара с соавт. [1]. Исследование ультратонких срезов проводили на электронном микроскопе просвечивающего типа «Technai G2 Spirit Twin» – Голландия. Фотографирование осуществлялось на микроскопе «Microphot FXA» (Nikon, Япония). Морфометрические исследования включали подсчет числа клеток (базальных промежуточных, реснитчатых, бокаловидных и тучных) на 100 мкм длины эпителиального пласта, на полутонких срезах, а также было проведено измерение площади базальной клетки и ее ядра на ультратонких срезах. Морфометрические исследования клеток трахеи выполнены в программе «Image Scope Color». Статистическую обработку проводили при помощи статистического пакета STATISTICA v. 6.0 for Windows (StatSoft Inc., 1984–2001). Полученные цифровые данные обработаны статистически стандартными параметрическими методами с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Поверхность слизистой оболочки трахеи выстлана многорядным мерцательным эпителием, состоящим из базальных, промежуточных, бокаловидных и реснитчатых клеток (рис. 1). Анализ качественного состава элементов эпителия показал, что в каудальном отделе трахеи число малодифференцированных клеток несколько больше по сравнению с краниальным (табл. 1, 2). Щелочная фосфоноэстераза является маркером стволовых клеток и в тоже время этот фермент позволяет оценить уровень обменных процессов происходящих в клетке. Чем выше активность щелочной фосфоноэстеразы, тем активнее происходят обменные процессы между мембраной базальных клеток, базальной мембраной и подлежащей соединительной тканью [4, 9]. Щелочная фосфоноэстераза интен-

сивно маркирует боковые и апикальные поверхности базальных клеток эпителия трахеи (рис. 3). В зоне базальной мембраны фермент выявляется в виде мелких гранул осмиофильного вещества разбросанных между тонкими фибриллами.

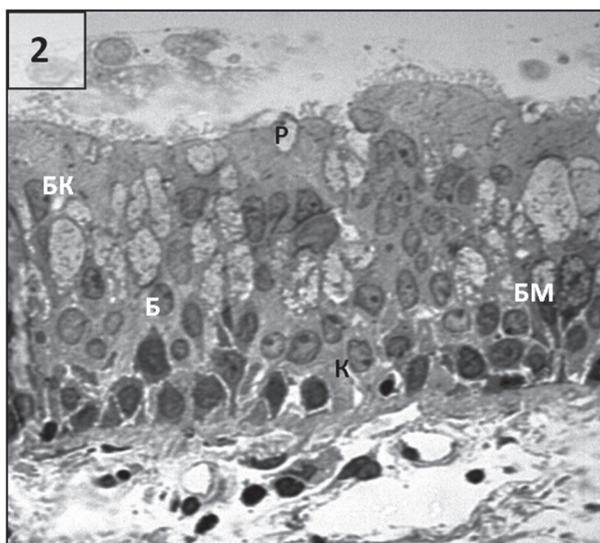
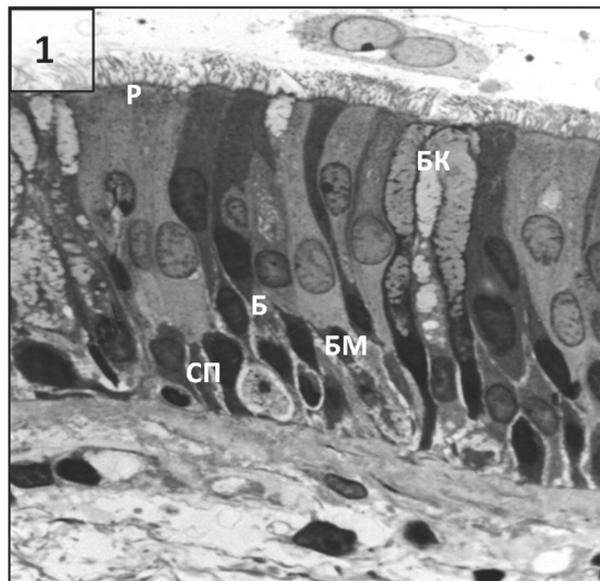


Рис. 1, 2. 1 – интактные, 2 – охлаждение 28 дней. Эпителий слизистой оболочки трахей: БК – бокаловидные клетки; Р – реснитчатые клетки; Б – базальные клетки; БМ – базальная мембрана; СП – собственная пластинка слизистой; К – кровеносный сосуд. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим. Увеличение: ок. 10, об. 100

При действии низких температур на организм изменяется соотношение клеточного состава эпителия (рис. 2), за счет значительного снижения малодифференцированных клеток (базальных и промежуточных) как в краниальном, так и в каудальном отделах трахеи. Анализ морфометрических данных выявил значительные уменьшение площади самой базальной клетки и ее ядра (табл. 1, 2). Снижение количества малодифференцированных клеток считают одним из наиболее важных элементов замедления регенерационного потенциала воздухоносных путей при действии низких температур [5, 7]. При охлаждении происходит изменение распределения маркера щелочной фосфоно-

ноэстеразы в базальных клетках. Выраженная потеря экспрессии фермента связана с изменением дифференцировки стволовых клеток, при которой изменяются взаимосвязи с клеточным окружением, и снижается уровень метаболизма между клетками и базальной мембраной (рис. 4). Действие низких температур приводит к увеличению миграции тучных клеток через эпителий, так их число в каудальном отделе трахеи повышается до $3,3 \pm 0,09$ (у интактных – $1,3 \pm 0,12$). Мигрирующие в эпителий тучные клетки являются важным элементом ниши, влияющим на дифференцировку базальных клеток [7]. В условиях эксперимента недоокисленные продукты метаболизма, выполняя функцию тканевых токсинов. Активная дегрануляция тучных клеток в эпителии, приводит к освобождению биологически активных веществ, вызывающих повреждение эпителиального барьера, изменяя функциональную активность стволовых клеток, таким образом снижая регенерационный потенциал. Повышение миграции тучных клеток связано с передачей информационного воздействия на «нишу» стволовых клеток через жидкую среду, которая уменьшает количество митозов малодифференцированных клеток в эпителии [3, 9]. При общем охлаждении организма в обоих отделах трахеи возрастает число бокаловидных клеток (табл. 1, 2). Важно отметить, что дифференцировка эпителиальных клеток слизистой краниального отдела при охлаждении направлена, преимущественно, в сторону увеличения на 74% числа секреторных элементов. Если в зоне бифуркации количество реснитчатых клеток незначительно возрастает, то в краниальном отделе этот показатель снижается на 6% и при этом размер клеток увеличивается за счет вакуолизации цитоплазмы.

Под воздействием холода на фоне введения дигидрокверцетина в организме крысы число малодифференцированных эпителиальных клеток в области бифуркации и в краниальном отделе трахеи в полтора раза больше, по сравнению с группой подверженных действию низких температур. Площадь базальной клетки и ее ядро возрастает и приближается к показателям характерным для интактных животных (табл. 1, 2). Значительно увеличивается количество продуктов реакции на щелочную фосфоноэстеразу в мембране базальных клеток. Гранулы реакции располагаются в виде черной полосы на базальном полюсе и очень четко контурируют границы клеток. Это свидетельствует об усилении метаболических процессов между клетками эпителия и базальной мембраной. Вероятно, идет активная подготовка к делению малодифференцированных клеток, а также отмечается изменение направленности дифференцировки, в сторону уменьшения количества бокаловидных клеток. Это свидетельствует о том, что в эпителии слизистой оболочке трахеи ускоряются процессы регенерации за счет активизации базальных и промежуточных клеток, число которых резко возрастает [9].

Таким образом, дигидрокверцетин проявляя антиоксидантный эффект, оказывает мембранопротекторное действие и стимулирует пролиферацию базальных и промежуточных клеток при этом количества бокаловидных клеток резко снижается [7].

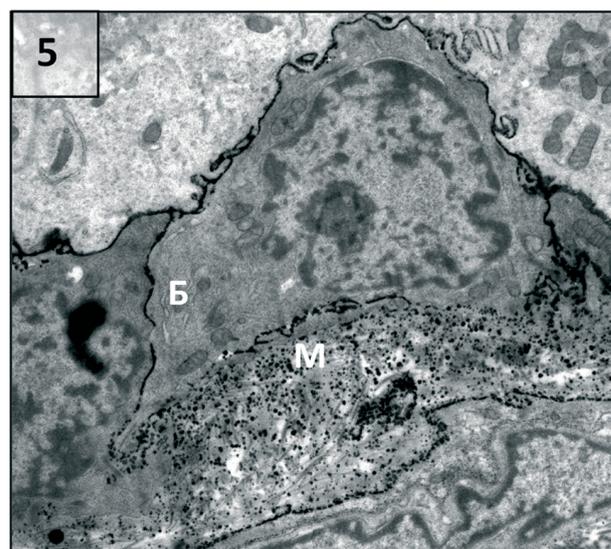
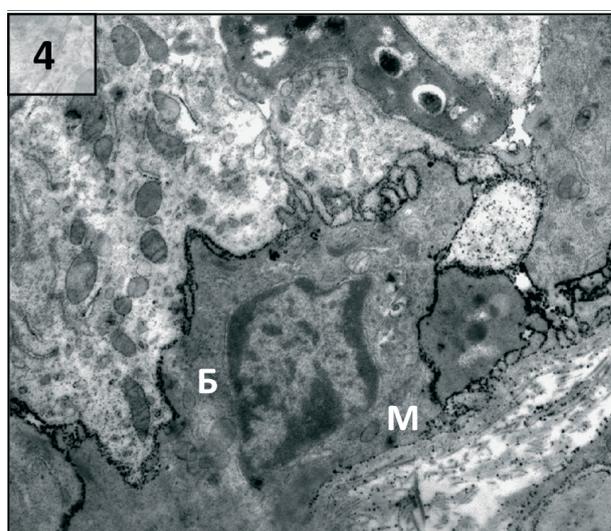
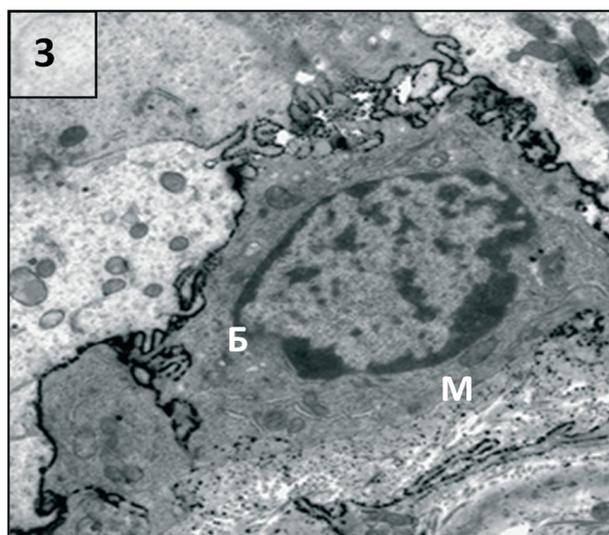


Рис. 3, 4, 5. Электронограммы базального отдела эпителия слизистой оболочки трахеи у крыс. 3 – интактные, 4 – охлаждение 28 дней, 5 – охлаждение 28 дней на фоне арабиногалактана. Б – базальная клетка, М – базальная мембрана. Заливка аралдит, эпон. окр. уранил ацетат, цитрат свинца. Реакция на щелочную фосфоноэстеразу по Майяхара с соавт. $\times 45000$

Таблица 1

Динамика изменений состава эпителия слизистой оболочки в краниальном отделе трахеи у интактных и экспериментальных крыс ($M \pm m$), $n=70$

Эксперименты	Интактные	Холод	Холод + ДКВ	Холод + Арабиногалактан
Группы	1	2	3	4
Реснитчатые клетки	32,5±1,30	30,4±1,03	31,7±0,30	31,5±0,40
Бокаловидные клетки	14,1±0,23	24,6±0,42**	14,5±0,16**	15,0±0,21**
Промежуточные клетки	6,2±0,20	0,6±0,16**	7,0±0,14**	6,5±0,16**
Базальные клетки	12,4±0,37	10,3±0,33**	16,8±0,29**	14,5±0,37**
Площадь базальной клетки (мкм ²)	33,0±0,15	21,0±0,22**	29,0±0,26**	24,3±0,27**
Площадь ядра базальной клетки (мкм ²)	22,6±0,18	12,3±0,22**	20,2±0,37**	17,3±0,24**
Число тучных клеток	1,2±0,14	3,2±0,12**	2,7±0,65**	4,1±0,17**

Примечание. ** – $p < 0,001$ уровень доверительной вероятности при сравнении 1-й и 2-й групп; * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,001$ уровень доверительной вероятности при сравнении 2-й и 4-й.

Таблица 2

Динамика изменений состава эпителия слизистой оболочки в каудальном отделе трахеи у интактных и экспериментальных крыс ($M \pm m$), $n=70$

Эксперименты	Интактные	Холод	Холод + ДКВ	Холод + Арабиногалактан
Группы	1	2	3	4
Реснитчатые клетки	25,9±0,48	26,5±0,58	25,2±0,20*	25,8±0,29
Бокаловидные клетки	8,6±0,42	16,0±0,57**	10,6±0,22**	10,9±0,27**
Промежуточные клетки	10,5±0,42	4,7±0,15**	6,5±0,16**	5,6±0,16**
Базальные клетки	13,3±0,26	10,5±0,16**	15,5±0,34**	14,1±0,48**
Площадь базальной клетки (мкм ²)	31,0±0,24	23,1±0,24**	30,1±0,32**	27,1±0,23**
Площадь ядра базальной клетки (мкм ²)	23,1±0,07	14,1±0,21**	21,7±0,14**	19,3±0,33**
Число тучных клеток	1,3±0,12	3,3±0,09**	2,8±0,57**	2,9±0,04**

Примечание. ** – $p < 0,001$ уровень доверительной вероятности при сравнении 1-й и 2-й групп; * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,001$ уровень доверительной вероятности при сравнении 2-й и 4-й.

Литература

1. Гайер Г. Электронная гистохимия. – М.: Мир, 1974. – 488 с.
2. Доровских В. А., Коршунова Н. В., Красавина Н. П. и др. Адаптогены и холодовой стресс: вчера сегодня, завтра ... : монография. – Благовещенск, 2006.
3. Красавина Н. П., Доровских В. А., Целуйко С. С. Морфофункциональная характеристика соединительной ткани органов дыхания при общем охлаждении организма на фоне медикаментозной коррекции // Дальневосточный медицинский журнал – 2002. – № 1. – С. 8.
4. Репин В. С., Ржанинова А. А., Шаменков Д. А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина: монография. – М.: Реметэк, 2002. – 176 с.

Анализируя показатели, полученные в эксперименте при действии холода на фоне применения арабиногалактана было отмечено, что число базальных клеток увеличивается как в краниальном, так и в каудальном отделе (табл. 1, 2). Количество продуктов реакции на щелочную фосфоноэстеразу увеличивается в мембране базальных клеток и, особенно в базальной мембране (рис. 5). Это указывает на усиление уровня метаболизма между малодифференцированными клетками и базальной мембраной. Если в области бифуркации трахеи количество малодифференцированных клеток увеличивается за счет базальных элементов, то в краниальном отделе отмечается рост числа промежуточных клеток. При действии холода на фоне введения арабиногалактана, происходит значительное уменьшение бокаловидных клеток как в краниальном, так и в каудальном отделах (табл. 1, 2).

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о повышении уровня митотической активности базальных клеток при применении арабиногалактана на фоне действия низких температур.

Выводы

1. При воздействии низких температур в эпителии слизистой оболочки трахеи наблюдается снижение митотической активности, что проявляется в уменьшении числа базальных и особенно промежуточных клеток, а также продуктов реакции на щелочную фосфоноэстеразу, морфологического маркера стволовых клеток. Это наиболее выражено в краниальном отделе трахеи. В базальной мембране снижается количество продуктов реакции на щелочную фосфоноэстеразу, что указывает на более о низкий уровень обменных процессов между эпителием и рыхлой соединительной тканью.

2. Применение дигидроокверцетина или арабиногалактана на фоне воздействия холода приводит к росту количества базальных и промежуточных клеток, особенно в краниальном отделе, также выявляется увеличение продуктов реакции на щелочную фосфоноэстеразу в мембране базальных клеток. Увеличение активности фермента в базальной мембране свидетельствует в пользу роста уровня обменных процессов между эпителием и соединительной тканью.

5. Целуйко С. С., Горбунов М. М., Семенов Д. А. Стволовые клетки трахеи крыс при холодовых воздействиях // Всероссийская научная конференция «Регенеративная биология и медицина»: сборник научных трудов НИИМЧ РАМН. – Москва, 2011. – С. 161–162.
6. Целуйко С. С., Красавина Н. П., Корнеева Л. С. и др. Гистофизиология легкого при экспериментальной гипергликемии на фоне введения дигидроокверцетина // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2011. – Вып. 40. – С. 18–22.
7. Целуйко С. С., Красавина Н. П., Семенов Д. А. и др. Современные взгляды на вопросы пролиферации и дифференцировки стволовых клеток органов дыхания в норме и при холодовых воздействиях // Бюллетень физиологии и патологии дыхания – 2012. – № 45. – С. 98–103.

8. Bischoff S. C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2008. – Vol. 11 – P. 733–740.
9. Hong K. U. Reynolds S. D., Watkins S. et al. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium // *Am. J. Pathol.* – 2004. – Vol. 164. – P. 577–588.
10. Martin U. Methods for studying stem cells: Adult stem cells for lung repair // *Methods.* – 2008. – № 45. – P. 121–132.
11. Mcqualter J. L., Bertoncello I. Concise review: Deconstructing the lung to reveal its regenerative potential // *Stem Cells* – 2012. – № 30. – P. 811–816.
12. Sen N., Weprin S., Peter Y. Discrimination between lung homeostatic and injury-induced epithelial progenitor subsets by cell-density properties // *Stem Cells and Development* – 2013. – № 22. – P. 2036–2046.
13. Tam A., Wadsworth S., Dorscheid D., et al. The airway epithelium: More than just a structural barrier (Review) // *Therapeutic Advances in Respiratory Disease.* – 2011. – № 5. – P. 255–273.
14. Vaughan A. E., Chapman H. A. Regenerative activity of the lung after epithelial injury // *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease.* – 2013. – № 1832. – P. 922–930.

Координаты для связи с авторами: *Целуйко Сергей Семёнович* – д-р мед. наук, профессор, проректор по научной работе, заведующий ЦНИЛ и кафедрой гистологии АГМА, тел. 8-(4162)-31-90-20; *Горбунов Михаил Михайлович* – канд. биол. наук, младший научный сотрудник ЦНИЛ АГМА; *Намаконова Виктория Сергеевна* – ассистент кафедры гистологии АГМА, врач кардиолог кардиологического отделения ГБУЗ АО «Амурская областная клиническая больница», тел. +8-(4162)-42-92-68; *Красавина Надежда Павловна* – д-р мед. наук, профессор кафедры гистологии АГМА, тел. 8-(4162)-31-90-20.

