

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛЕГКИХ КРЫС В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАНИЯ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ И СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Зиновьев С.В., Плехова Н.Г., Шуматов В.Б.

ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток, e-mail: sinowev@mail.ru

Синдром системного воспаления (СВ) возникает при ответе организма на повреждение с участием центральной нервной, эндокринной систем и внутренних органов. Цель исследования: провести экспериментальное структурно-функциональное исследование состояния дистальных бронхов легких крыс при нанесении черепно-мозговой травмы (ЧМТ) и ее сочетании с СВ. Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самцах Wistar (масса тела 200–250 г). Для воспроизведения ЧМТ средней степени использовали модифицированную модель падающего груза. Для исследования экспериментальной лихорадки животным вводили раствор пирогенала (ПГ). Сочетание ЧМТ с СВ у животных характеризовалось повышением температуры тела и количества лейкоцитов в периферической крови на 4-й день эксперимента, которое сохранялось до конца срока наблюдения (6 суток). В легких этих крыс отмечались структурные изменения дистальных бронхов, которые проявлялись уменьшением диаметра просвета дыхательных путей, накоплением бронхиального секрета с высоким содержанием эндотелина-1 и CD14 позитивных клеток. Одновременно уменьшалась толщина аргирофильных соединительнотканых волокон стенки дистальных воздухоносных путей. На поверхности терминальных бронхиол легких обнаруживалось достоверное уменьшение процентного содержания клеток Клара, отмечалась тенденция к понижению их высоты и уменьшению размера ядер. Таким образом, полученные данные указывают на развитие бронхоспазма на фоне накопления секрета в воздухоносных путях легких в условиях сочетания ЧМТ и СВ.

Ключевые слова: дистальные бронхи, черепно-мозговая травма, системное воспаление, аргирофильные волокна, соединительная ткань

Исследование выполнено при финансовой поддержке внутривузовского гранта ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России.

STRUCTURAL CHANGES IN THE LUNGS OF RATS IN CONDITIONS OF A COMBINATION TRAUMATIC BRAIN INJURY WITH SYSTEMIC INFLAMMATION

Zinoviev S.V., Plekhova N.G., Shumatov V.B.

Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: sinowev@mail.ru

Systemic inflammation syndrome (SI) occurs when the body responds to damage with the participation of the central nervous, endocrine systems and internal organs. The purpose of the study: to conduct an experimental structural and functional study of the state distal bronchi lungs rat's in inflicted with traumatic brain injury (TBI) and its combination with SI. The experiment was carried out on mature male Wistar rats (body weight 200–250 g). A modified falling weight model was used to reproduce moderate TBI. For the study of experimental fever, the animals were injected with a solution of pyrogenal (PG). The combination of TBI with SI in animals was characterized by an increase in body temperature and the number of leukocytes in the peripheral blood on the 4th day of the experiment, which persisted until the end of the observation period (6 days). In the lungs of these rats, structural changes in the distal bronchi were noted, which were manifested by a decrease in the diameter of the airway lumen, the accumulation of bronchial secretions with a high content of endothelin-1 and CD14 positive cells. At the same time, the thickness of the argyrophilic connective tissue fibers of the wall of the distal airways decreased. On the surface of the terminal bronchioles of the lungs, a significant decrease in the percentage of Clara cells and a tendency to a decrease in their height and a decrease in the size of the nuclei were found. Thus, the data obtained indicate the development of bronchospasm against the background of secretion accumulation in the airways of the lungs in conditions of a combination of TBI and SI.

Keywords: distal bronchi, traumatic brain injury, systemic inflammation, argyrophilic fibers, connective tissue

The study was supported by an intra-university grant from the Pacific State Medical University of the Russian Ministry of Health.

Синдром системного воспаления (СВ) возникает при ответе организма на повреждение при взаимодействии центральной нервной, эндокринной систем и внутренних органов, которое направлено на сохранение гомеостаза [1]. По отношению к очагу воспаления возникают две взаимодополняющие генетически детерминированные программы: внутренняя (на локальном уровне) и внешняя системная воспалительная реакция, последняя возможна при условии чрезмерно выраженного местного воспаления и/или его барьерной несостоятельности [2, 3]. При черепно-мозговой травме (ЧМТ) локализованное в головном мозге нейровоспаление способствует появлению острого респираторного дистресс-синдрома в легких [4]. Возможной мишенью в виде общего звена патогенеза при сочетании ЧМТ и СВ могут являться волокна соединительной ткани легкого, роль которой малоизучена в механизме развития патологии. Структурно реакция соединительной ткани при патологии и адаптации представлена: склерозом, дистрофией, воспалением, регенерацией и т.д. При оценке типа реакции соединительной ткани необходимо исходить из принципов взаимодействия структурных единиц тканей, в которых генетически детерминировано соотношение стромы и паренхимы. Органометрические характеристики вторичной долики легких и наличие соединительнотканых перегородок на уровне законов механики жестко определяют резервные возможности внешнего дыхания. Сочетание острого церебрального повреждения и легочной патологии затрагивает стромально-паренхиматозное соотношение нарушению дистальные отделы воздухоносных путей с развитием воспалительной реакции, включая ретикулярные и преколлагеновые волокна. Роль аргирофильных (ретикулярных) волокон в развитии патологии органов дыхания при сочетании ЧМТ и СВ малоизучена, тогда как нарушение их функциональности в последующем оказывает значительное влияние на соединительную ткань бронхов [5]. Цель исследования: провести экспериментальное структурно-функциональное исследование состояния дистальных бронхов легких крыс при сочетании ЧМТ и СВ.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самцах Wistar (масса тела 200–250 г, возраст 12 недель), полученных из питомника лабораторных животных (г. Пущино, филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Эксперимент осуществляли в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и рекомендациям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных. Дизайн исследования одобрен междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 9 от 16.05.2022 г.). Общую анестезию производили с помощью внутримышечного введения золетила 100 в дозе 20 мг/кг массы тела крыс («Virbac», Франция). Для воспроизведения ЧМТ средней степени использовали модифицированную

модель падающего груза [6]. Для нанесения травмы применяли установку с грузом (масса 200 г), который падал с высоты 1 м на теменную область головы животного. Для индукции СВ животным с учетом массы тела внутримышечно вводили водный раствор пирогенала (0,7 мл) в дозе 33,3 мкг/кг троекратно на 1-е, 3-и, 4-е сутки (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Животные были распределены на следующие группы: 1 – интактные крысы, без нанесения ЧМТ и СВ (6 крыс); 2 – крысы при нанесении ЧМТ средней степени (6 крыс); 3 – крысы с индуцированным СВ (6 крыс); 4 – травмированные крысы при троекратном введении пирогенала в дозе 33,3 мкг/кг на 1-е, 3-и, 4-е сутки (6 крыс). Ректальную температуру тела крыс измеряли с помощью медицинского цифрового термометра «Amrus AMDT-14 Swing» (Китай), количество лейкоцитов в периферической крови подсчитывали в камере Горяева, % незрелых нейтрофилов оценивали в мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе. После общей анестезии на 6-й день производили вскрытие грудной клетки для вивисекции легких, которые фиксировали в 96%-ном этиловом спирте в течение 24 ч, после чего получали кусочек органа размером 10×10×10 мм, проводили его через хлороформ, заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином, толуидиновым синим, импрегнировали серебром по методу Фута (ООО Биовитрум, Санкт-Петербург). Морфометрическое исследование проводили с помощью программного обеспечения Cell Sens standard Olympus и NIS-Elements (Nikon, Япония). Иммуногистохимическое исследование локализации эпитопов CD14 и CD 45 в клетках оценивали с помощью наборов Elabscience с пероксидазной детекцией DAB методом (Abcam, США).

Статистический анализ результатов проводили с применением программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Значения представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Данные по группам проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента для сравнительных исследований. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. У травмированных животных при сочетании с СВ на 4-й день эксперимента обнаружена субфебрильная гипертермия, которая сохранялась до конца срока наблюдения (6 суток) и сопровождалась повышением количества лейкоцитов в периферической крови (табл. 1).

Таблица 1

Показатели термометрии и количества клеток крови животных

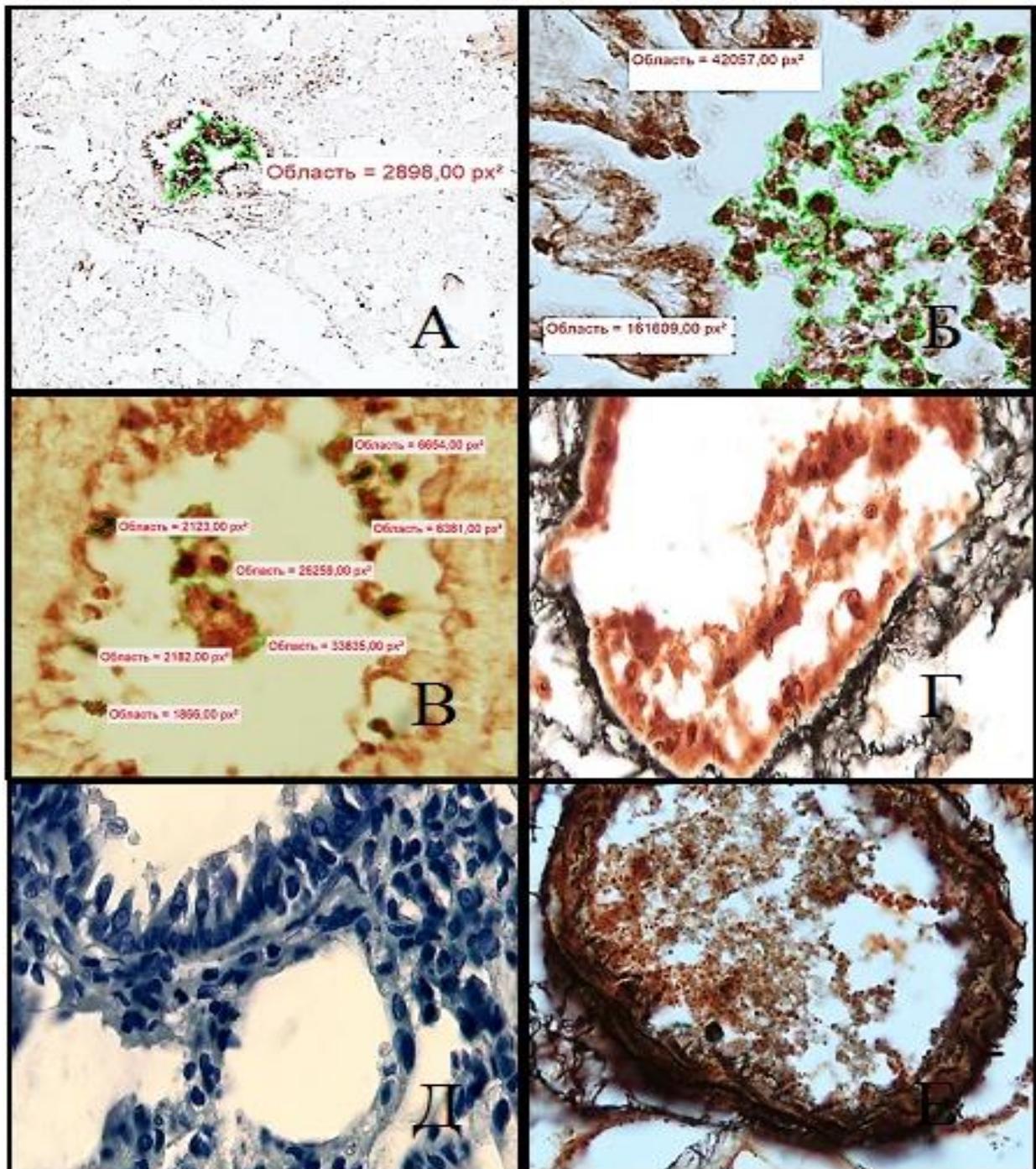
Показатель	1-я группа (n=6)	2-я группа (n=6)	3-я группа (n=6)	4-я группа (n=6)
4-й день после начала эксперимента				
Ректальная термометрия, °С	37,4±0,049	37,6±0,045 (1-4)*	37,9±0,06 (1-3)**	38,5±0,065 (1-4)***

Количество лейкоцитов $\times 10^9/\text{л}$ в 1 л крови	12,1 \pm 0,61	13,6 \pm 0,73 (1–2)*	9,7 \pm 0,55 (1–3)**	9,5 \pm 0,7 (1–4)**
% палочкоядерных сегментоядерных лейкоцитов	4,4 \pm 0,72	5,2 \pm 0,51 (2–4)*	8,8 \pm 0,65 (1–3)***	8,8 \pm 0,64 (1–4)***
6-й день после начала эксперимента				
Ректальная термометрия, °С	37,5 \pm 0,05	37,6 \pm 0,05	37,4 \pm 0,07 (3–4)**	37,8 \pm 0,07 (1–4)**
Количество лейкоцитов $\times 10^9/\text{л}$ в 1 л крови	12,3 \pm 0,65	12,3 \pm 0,57 (2–4)*	13,2 \pm 0,68 (3–4)*	15,7 \pm 0,82 (1–4)**
% палочкоядерных сегментоядерных лейкоцитов	4,1 \pm 0,63	5 \pm 0,45 (2–4)*	6 \pm 0,58 (1–3)*	6,9 \pm 0,58 (1–4)**

Примечание: 1-я группа – животные без нанесения ЧМТ и введения пирогенала; 2-я группа – животные после нанесения ЧМТ; 3-я группа – животные, которым троекратно вводили пирогенал в дозе 33,3 мкг/мл на 1-е, 3-и, 4-е сутки; 4-я группа – травмированные животные, которым троекратно вводили пирогенал в дозе 33,3 мкг/кг на 1-е, 3-и, 4-е сутки; * достоверное различие между показателями при $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

При оценке негативного воздействия среды на организм экспериментальных животных характеристика структурных единиц органов дыхания позволяет провести интерполяцию полученных данных на возможную реакцию человеческого организма. У крыс при наличии 5 долей в легких, в отличие от правого, левое легкое крыс представлено одной долей. Внутрилегочные бронхи (ВБ) легких крыс подразделяются на четыре порядковые генерации. К первой относится экстрапульмонарный каудальный бронх (1200–1500 мкм), между ним и дистальными ВБ (150–300 мкм) находятся бронхи 2-го порядка (400–600 мкм), которые переходят в малые (150–300 мкм), которые являются наиболее протяженными по направлению к дорсальному и вентральному краям, латеральной и медиальной поверхностям легких. Проксимальные ВБ третьей генерации имеют складчатую поверхность и покрыты кубическим реснитчатым эпителием, где бокаловидные клетки отсутствуют. Слизистая оболочка дистальных бронхов с нескладчатой поверхностью покрыта кубическим нереснитчатым эпителием с клетками Клара. Обнаружены выраженные изменения дистальных воздухоносных бронхов третьей и четвертой генерации у крыс при сочетании ЧМТ и СВ, тогда как после нанесения только ЧМТ или введения пирогенала таких изменений не выявлено (табл. 2). Также в легких этих крыс отмечалось достоверное уменьшение диаметра просвета бронхов на 6-й день по сравнению с показателями для остальных животных. При окрашивании гематоксилин-эозином и толуидиновым синим в соединительных тканях легкого крыс и дистальных ВБ выявлялись разветвленные и длинные структуры толщиной до 2,4 мкм, которые характерны для незрелых коллагеновых и эластических волокон (рисунок). Тонкие соединительнотканые аргирофильные волокна в виде плотных сплетений располагались в

области границы базальной части бронхиального эпителия и собственной пластинки слизистой и адвентициальной оболочек дистальных ВБ (рисунок), количество которых увеличивалась у животных при сочетании ЧМТ и СВ (табл. 2). Такие волокна окружали мышечную пластинку и переходили в область контакта с тканями ацинусов легких и кровеносных сосудов. Также у этих крыс в просвете ВБ 2-го, 3-го и 4-го порядка увеличивалось количество клеток бронхиального секрета с аргентофинными ядрами и ядрышками. На поверхности слизистых оболочек бронхов легких крыс при сочетании ЧМТ и СВ, а также в бронхиальном секрете выявлялись многослойные скопления эндотелин-1 и CD14 позитивных клеток с аргентофильными ядрышками (рисунок).



Бронхи легкого травмированных крыс при системном воспалении, 6-й день эксперимента. Бронхиальный секрет с наличием CD14 позитивных клеток в бронхах 4-го (А), 3-го порядков (Б) и клеток, содержащих эндотелин-1 (В) с выделенными областями для морфометрии. Стенка бронха 4 порядка с аргирофильными волокнами и секретом, содержащим клетки (Г). Клетки Клара и нереснитчатый кубический эпителий в бронхе 4-го порядка (Д). Эритроциты с гранулами в бронхиальной артерии (Е). А, Б, В – иммуногистохимическое окрашивание; Г, Е – метод Фута. Д – толуидиновый синий; ув. x1000 а. А – ув. x1000; Б, В, Г, Д, Е – ув. x1000

В легких этих крыс обнаружена частичная обтурация (25–50%) просвета дистальных бронхов (табл. 2). Учитывая сложный характер бронхиального дерева у крыс, авторами было изучено строение терминальных бронхиол (бронхов 4-го порядка), где встречаются клетки Клара в покровном эпителии. Эти клетки имеют булавовидное тело, что отличает их от кубического нереснитчатого эпителия, а их апикальная часть возвышается над ним, формируя второй ряд клеток. В легких травмированных крыс при СВ на поверхности терминальных бронхиол было обнаружено достоверное уменьшение процентного содержания клеток Клара и отмечалась тенденция к понижению их высоты с уменьшением размера ядер.

Таблица 2

Показатели морфометрии тканей легкого животных на 4-й день после начала эксперимента

Показатель	1-я группа (n=6)	2-я группа (n=6)	3-я группа (n=6)	4-я группа (n=6)
Длина ядра клеток Клара, мкм	9,30±0,49	9,1±0,6 (2–4)*	8,7±0,3 (3–4)*	7,2±0,34 (1–4)**
Высота клеток Клара, мкм	23,0±0,98	22,0±1,29	21,0±2,1	18,25±1,04 (1–4)**
Длина ядра клеток кубического бронхиального эпителия, мкм	8,71 ±0,328	8,2 ±0,45	8,32 ±0,26	7,42±0,32 (1–4)*
Длина клеток нереснитчатого кубического бронхиального эпителия, мкм	17,58±0,5	17,2±0,35 (2-4)**	16,6±0,44 (3-4)*	13,39±0,71 (1-4)***
Обтурация аргирофильными клетками бронхиального секрета ВБ, %	0,01±0,01	0,01±0,01 (2–4)*	0,01±0,01 (3–4)***	15±2% (1–4)***
Диаметр бронхов 3-го порядка, мкм	280,3±8,2	265,6±10,4	270,2±9,8 (3–4)*	238,5±8,6 (1–4)**
Диаметр бронхов 4-го порядка, мкм	275,2±7,9	263,7±5,7 (2–4)*	282,9±11,6 (3–4)**	234,6±8,3 (1–4)**
Толщина базального аргирофильного слоя стенки дистальных бронхов, мкм	3,99±0,5	4,44±0,6 (2–4)**	4,75±0,5 (3–4)**	7,63 ±0,4 (1–4)***
Толщина аргирофильных волокон, мкм	1,26±0,1	1,33±0,1	1,47±0,1	2,03±0,23 (1–4)*
Средняя оптическая плотность аргирофильных волокон/ пиксель	1,028±0,05 3	1,16±0,06 (2–3)*	1,11±0,05 (3–4)*	1,503±0,12 (1–4)***

Количество клеток в бронхиальном секрете в поле зрения	5,4±0,68	6,6±0,7 (2–4)**	7,2±0,9 (3–4)**	11,3±0,8 (1–4)***
Площадь позитивной реакции на CD14/ пиксель	0,67±0,01 2	0,63±0,01 (2–4)*	0,69±0,01 (3–4)*	0,729±0,02 (1–4)**
Площадь позитивной реакции на эндотелин-1/ пиксель	0,397±0,02 4	0,4 ±0,02 (2–4)*	0,418±0,02 (3–4)*	0,482±0,01 (1–4)**

Примечание: 1-я группа – животные без нанесения ЧМТ и введения пирогенала; 2-я группа – животные после нанесения ЧМТ; 3-я группа – животные, которым троекратно вводили пирогенал в дозе 33,3 мкг/мл на 1-е, 3-и, 4-е сутки; 4-я группа – травмированные животные, которым троекратно вводили пирогенал в дозе 33,3 мкг/кг на 1-е, 3-и, 4-е сутки; достоверное различие между показателями для 1-й группы и 2-й, 3-й, 4-й групп при * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Клиническое заключение о наличии СВ дается при определении таких симптомов, как повышение более 38°C либо понижение менее 36°C температуры тела, частота сердечных сокращений больше 90 в 1 минуту, частота дыхательных движений более 20 в 1 минуту, PaCO₂ в крови менее 32 мм рт. ст., количество лейкоцитов в формуле крови более 12х10⁹/л или менее 4х10⁹/л и незрелых форм гранулоцитов более 10% [1]. Для моделирования СВ на животных используют эндотоксины бактерий (липополисахарид, пирогенал) по причине их пирогенных и цитотоксических свойств и появления компенсированности структурных изменений в тканях, которые происходят в ответ на введение доз, значительно (до 300 раз) превышающих стандартные (МПД – 0,0075±0,0025 мкг на 1 кг веса кролика) [7]. Авторами установлено, что у травмированных животных при введении пирогенала отмечается компенсированный характер реакции тканей воздухоносных путей при отсутствии метахромазии волокон соединительной ткани легких. Получены данные об уменьшении внутреннего диаметра просвета дистальных ВБ у этих крыс. При этом тенденция к развитию бронхоспазма происходила на фоне накопления секрета в воздухоносных путях на 6-й день эксперимента. Отмечалось дистрофическое паренхиматозное изменение строения бронхиального эпителия терминальных бронхиол при ЧМТ и СВ. Воспалительный характер реакций дистальных воздухоносных путей подтверждался наличием CD14 и эндотелин-1 позитивных клеток, что указывает на повышенное содержание макрофагов в бронхиальном секрете и наличие биосинтеза эндотелина-1 клетками воспаления, как и сообщалось другими исследователями ранее [7]. Также необходимо отметить участие аргирофильных волокон стенок дистальных ВБ в формировании патологических реакций органов дыхания при сочетании ЧМТ и СВ. Показано, что ретикулярные (коллаген III типа) и преколлагеновые аргирофильные волокна принимают участие в формировании соединительной ткани стенки бронхов и альвеол как в норме [8], так и при коронавирусной инфекции и идиопатическом фиброзе легких [9]. В нашем эксперименте у травмированных крыс при СВ выявлялись соединительнотканые волокна до

2,5 мкм толщиной, функцией которых является взаимодействие с прилегающими структурами адвентиция.

Заключение. При экспериментальном моделировании сочетания ЧМТ и СВ в легких животных обнаруживаются уменьшение диаметра просвета дыхательных путей, структурные изменения дистальных бронхов и высокое содержание в их секрете эндотелин-1 и CD14 позитивных клеток на фоне увеличения толщины аргирофильных соединительнотканых волокон стенки дистальных воздухоносных путей.

Список литературы

1. Иващенко В.В., Чернышев И.В., Перепанова Т.С., Никонова Л.М., Казаченко А.В. Стресс и синдром системного воспалительного ответа // Экспериментальная и клиническая урология. 2012. №4. С. 20-22.
2. Никитин В. А., Васильева Л. В., Толстых Е. М., Ноговицына А. С. Роль системного воспаления в развитии коморбидности при хронической обструктивной болезни легких // Туберкулез и болезни лёгких. 2017. Т. 95. № 6. С. 61-66.
3. Гельцер Б.И., Котельников В.Н., Кожанов А.Г. Респираторно-мышечная дисфункция дыхательной мускулатуры и хроническая обструктивная болезнь легких: патофизиологические взаимосвязи и клиническое значение // Тихоокеанский медицинский журнал. 2022. Т.1. № 87. С. 17-25.
4. Плехова Н.Г., Гельцер Б.И., Зиновьев С.В., Заяц Ю.В. Морфофункциональные особенности коры больших полушарий мозга при сочетании хронической обструктивной болезни легких и ишемического инсульта // Архив патологии. 2019. Т. 81. №3. С. 19-26.
5. Тодоров С.С., Дерибас В.Ю., Казьмин А.С., Резникова Г.Л., Макаренко Ю.М., Полесовой Ф.В., Тодоров (мл) С.С. Патоморфологические изменения в сосудах легких в разные сроки летальных исходов больных при COVID-19 // Медицинский вестник Юга России. 2021. Т.12. №2. С.54-61.
6. Радьков И.В., Плехова Н.Г., Дюйзен И.В., Зиновьев С.В., Барышев А.Н. Способ моделирования ушиба головного мозга лёгкой степени// Патент РФ № 2725287. Патентообладатель ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России.2020. Бюл. № 19.
7. Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM. Role of endothelin-1 in lung disease // Respir Res. 2001. Vol.2. No2. P. 90-101.
8. Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint // Arch Histol Cytol. 2002. 65(2). P. 109-126.

9. Samborska, I. A. Changes in the histostructure of the lungs of old rats under conditions of persistent hyperhomocysteinemia // Biomedical and Biosocial Anthropology. 2020. Vol.41. P. 41-45.