

## МЕТОД ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ЦИЛИАРНОЙ АКТИВНОСТИ МНОГОРЯДНОГО СТОЛБЧАТОГО РЕСНИТЧАТОГО ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ НОСА У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

С.В. Барашкова<sup>1,3</sup>, младший научный сотрудник,  
С.Г. Журавский<sup>2,3</sup>, доктор медицинских наук, руководитель  
группы экспериментальной патоморфологии,  
С.И. Алексеенко<sup>1,4</sup>, кандидат медицинских наук, доцент

<sup>1</sup>Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Детская городская больница имени К.А. Раухфуса», 191036, Россия, Санкт-Петербург, Лиговский пр-т, д. 8;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8;

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2;

<sup>4</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41  
e-mail: patanatomdgb19@yandex.ru

**Резюме.** Представлены результаты сравнительного исследования прижизненного цитологического материала многорядного столбчатого реснитчатого эпителия слизистой оболочки полости носа интактных взрослых крыс самцов стока Wistar (220–250 г), содержащихся в вивариях конвенционального типа (n=2) и SPF-категории (n=2). Интактная картина клеток многорядного столбчатого реснитчатого эпителия отмечена в материале животных SPF-статуса. У животных конвенционального вивария наблюдали проявления подострого воспаления и персистирования бактериальной инфекции. При этом имели место морфофункциональные признаки дегенерации цилиарного аппарата: укорочение, асинхронизм и неполный цикл биения цилий. Наилучшее качество цитологического материала при браш-биопсии *in vivo* было получено при использовании комбинированных цервикальных щеток «Cervex-Brush Combi» из полимерного материала, модифицированных путем тримминга щетинок центрального ершика.

**Ключевые слова:** цилиарный аппарат, фазовый контраст, высокоскоростная видеорегистрация, нативный цитологический материал, крысы SPF статуса.

**Для цитирования:** Барашкова С.В., Журавский С.Г., Алексеенко С.И. Метод прижизненной диагностики цилиарной активности многорядного столбчатого реснитчатого эпителия слизистой оболочки полости носа у лабораторных крыс. Лабораторные животные для научных исследований. 2018; 1: DOI: 10.29926/2618723X-2018-01-07

## THE METHOD OF INTRAVITAL DIAGNOSIS OF CILIARY ACTIVITY OF COLUMNAR CILIATED EPITHELIUM OF THE NASAL MUCOSA IN LABORATORY RATS

Barashkova S.V.<sup>1,3</sup>, Zhuravky S.G.<sup>2,3</sup>, Alekseenko S.I.<sup>1,4</sup><sup>1</sup>Children's City Hospital № 19 named after K.A. Rauhfus, b.8, Ligovsky Avenue, Saint Petersburg, 191036, Russia<sup>2</sup>Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, b. 6-8, L. Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022, Russia<sup>3</sup>Almazov National Medical Research Centre, b.2, Akkuratov str., Saint Petersburg, 197341, Russia<sup>4</sup>Mechnikov North-West State Medical University, Kirochnaja, 41, Saint Petersburg, 191015, Russia, e-mail: patanatomdgb19@yandex.ru

**Summary.** The results of a comparative study of the intravital cytological material of the columnar ciliated epithelium of the nasal cavity from intact adult rats of the Wistar (220-250 g) contained in the conventional type vivarium (n = 2) and SPF category (n = 2) are presented. An intact picture of cells of the columnar ciliated epithelium is noted in the material of SPF animals. A subacute inflammation and persistence of bacterial infection in animals of the conventional vivarium were observed. In this case, there were morphofunctional signs of degeneration of the ciliary apparatus: shortening, asynchronism and incomplete cycle of beating of the cilia. The best quality of the cytological material for in-vivo biopsy was obtained by using the combined cervical brushes «Cervex-Brush Combi» made of a polymer material modified by trimming the bristles of the central brush.

**Key words:** ciliary apparatus, phase contrast, high-speed video imaging method, native cytological material, rats of SPF-status.

**For citation:** Barashkova S.V., Zhuravky S.G., Alekseenko S.I. The method of intravital diagnosis of ciliary activity of columnar ciliated epithelium of the nasal mucosa in laboratory rats. *Laboratory Animals for Science*. 2018. #1. DOI: 10.29926/2618723X-2018-01-07

## Введение

Экспериментальные исследования, связанные с морфофункциональным анализом состояния многорядного столбчатого реснитчатого эпителия верхних дыхательных путей нацелены на изучение влияния лекарственных препаратов и фармакологических аддитивов на цилиарную активность [1–3]. Традиционно для этого используют метод культивирования реснитчатого эпителия иссеченной перегородки носа, эпителия трахеальных колец или эпителия дистальных отделов дыхательных путей в тонких срезах легочной ткани, полученных от умерщвленных животных [1, 2, 4, 5]. Особенность метода – необходимость затратной материально-технической базы на культивирование эпителиальных клеток *in vitro*, зависящих от таких факторов, как температура, влажность, рН, вязкость и ионный состав инкубационной среды [3]. При этом отсутствует возможность оценивать функцию и морфологию мукоцилиарной системы в экспериментах *in vivo*, моделирующих клинические условия.

Разработка метода получения в хроническом эксперименте *in vivo* на повседневно использующихся биологических тест-системах (лабораторных грызунах) нативного материала многорядного столбчатого реснитчатого эпителия позволит проводить динамическое наблюдение при экспериментальной патологии, скрининг фармакологических субстанций по цилиоактивным свойствам. Актуальность

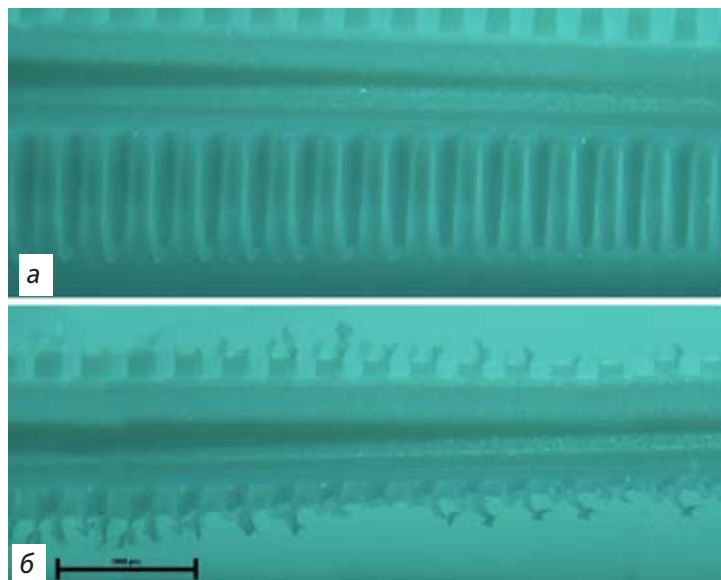


Рис. 1. Инструменты для брашинга слизистой оболочки полости носа крыс: а – оригинальная цитологическая щетка Cervex-Brush Combi («Rovers Medical Devices», Нидерланды); б – то же после тримминга щетинок центрального ершика. Бинокулярная лупа Nikon MZS 18;  $\times 8$  (шкала бар 2000 мкм)

нашего эксперимента обусловлена также появлением перспективного направления топического применения вакцин, аэрозольных препаратов для коррекции генетических заболеваний, лечения опухолей носоглотки и легких [6, 7].

Цель исследования – разработка метода для изучения цилиарной активности многорядного столбчатого реснитчатого эпителия слизистой оболочки полости носа *in vivo* у лабораторных крыс.

### Материал и методы

В работе использованы 4 крысы – самцы стока Wistar массой 220–250 г, содержащиеся в условиях конвенционального вивария (n=2; ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская область) и вивария SPF-категории (n=2; ПЛЖ «Пушино», Московская область). Процедура браш-биопсии проводилась неоднократно у животных, находящихся в условиях общей анестезии при интраперитонеальном введении препарата «Золетил 100» (6 мг/кг) и ингаляционном введении воздушной смеси с 2,5% содержанием изофлюрана. Для выполнения браш-биопсии применяли различного вида инструментарий, доступный на рынке медицинских средств. Цитологический материал слизистой оболочки носовой перегородки и нижней носовой раковины получали на глубине 1–1,5 см от кожной части преддверия носа, ориентируясь на проекцию резцового сосочка и первого небного гребня – в зоне наибольшего представительства на слизистой оболочке полости носа многорядного столбчатого реснитчатого эпителия [8, 9].

При проведении браш-биопсии сравнивали качество материала, полученного при использовании интрадентальных ершиков Curaprox prime 0,6–2,2 мм с держателем (Curaprox, Германия), цитологических щеток Cervex-Brush Combi (Rovers

Medical Devices, Нидерланды), цитологических щеток для эндоскопов Olympus (Olympus, Япония) (рис. 1). Весь имевшийся инструментарий предварительно модифицировали следующим образом: нейлоновые щетинки интрадентальных ершиков и цитологических щеток для эндоскопов обстригали ножницами до их основания, у цитологической щетки Cervex-Brush Combi удаляли боковые щетинки, центральный ершик разделяли пополам с помощью микротомного лезвия, оставляя одну рабочую поверхность, покрытую ворсинками, укороченными с помощью ножниц до основания, апикальный край оплавливали на открытом пламени горелки в течение 1 с. Стерилизация перед процедурой проводилась в этиловом спирте 95° в течение 40 мин.

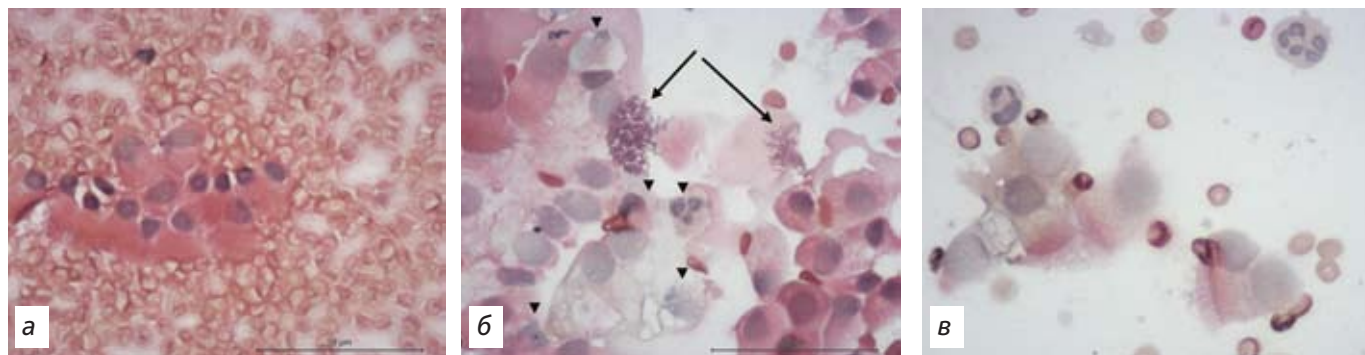
После взятия материала кончик щетки споласкивался в пробирке Эппендорф с 0,5 мл физиологического раствора (37°C). Полученную суспензию в объеме 50 мкл немедленно наносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом. Визуальный анализ нативного материала проводился на микроскопе Nikon Eclipse E200 с дополнительной комплектацией для фазового контраста с объективами CFI Achromat DL ×40 и CFI Achromat ×100 oil (Nikon, Япония). Для каждого образца в режиме реального времени записывался цифровой видеофайл с частотой в среднем 76,5 кадров в секунду с помощью высокоскоростной цветной камеры Basler puA2500-14uc USB3.0. Морфометрическая обработка видеороликов осуществлялась в программе MMC Multimeter (MMCSoft, Россия). Оставшийся материал наносился на предметные стекла с помощью цитоцентрифуги Cyto-Tek (Sakura, Япония) и окрашивался гематоксилином Гарриса по Папаниколау и эозином-метиленовым синим по Май-Грюнвальду Гимза.

## Результаты и обсуждение

Выполнение биопсии с помощью нейлоновых ершиков и браш-щеток для эндоскопов очень травматично для слизистой оболочки полости носа. Полученный материал имел выраженные искусственные изменения в виде большого количества эритроцитов, мешающих проведению видеорегистрации, а также клетки низкого качества в связи с их механической деструкцией и дегенерацией (рис. 2, а). Кроме того, длина рабочей поверхности использованных инструментов не позволяла без дополнительной травмирующей компрессии преддверия достигать необходимого уровня глубины полости носа.

Наилучшие результаты были получены с помощью полимерных комбинированных гинекологических щеток Cervex-Brush Combi (Rovers Medical Devices, Нидерланды) после их модифицирования для наименьшего травмирования слизистой оболочки путем тримминга щетинок центрального ершика (см. рис. 1). Таким инструментом у взрослой крысы удалось изъять достаточный объем цитологического материала при минимальном загрязнении эритроцитарной массой и хорошей сохранности пластов клеток многорядного реснитчатого эпителия (рис. 2, в).

Обратим внимание, что цитологический материал крыс, содержащихся в условиях конвенционального вивария, во всех случаях показывал высокую бакте-



**Рис. 2.** Цитологический материал, полученный при заборе разными инструментами (окраска гематоксилином Гарриса по Папаниколау, ув.  $\times 400$ ): а – искусственные изменения в виде большого количества эритроцитов, выраженных дегенеративных изменений эпителиоцитов; б – примесь бактериальной микрофлоры (стрелки), разрушающиеся нейтрофилы (треугольники), выраженные дистрофические изменения эпителия с укорочением и частичной десквамацией ресничек; (а и б – цитологический материал от крыс, содержащихся в вивариях конвенционального типа); в – цитологический материал хорошего качества, приемлемый для морфометрического исследования (цитологический материал от крыс SPF-статуса)

риальную обсемененность, наличие нейтрофильного экссудата, выраженные реактивно-дистрофические изменения многорядного респираторного эпителия с укорочением и повышенным слущиванием цилий (рис. 2, б). Эти изменения расценивались как признаки текущего подострого воспаления. Двигательная активность цилиарного аппарата была зарегистрирована лишь на минимальном количестве клеток с явлениями асинхронизма, неполного цикла биения цилий, что не позволяло провести полноценной морфометрической оценки.

В образцах, полученных у животных SPF-статуса, отсутствовала микрофлора и элементы воспалительного экссудата. При морфометрическом анализе выявлена неравномерная частота биения ресничек в различных пластах в пределах диапазона нормальных значений (7,94–13,87 Гц). Различий в качестве полученного цитологического материала (визуальное состояние клеток эпителия, двигательная активность цилиарного аппарата) при браш-биопсиях, проводимых в условиях газовой и интраперитонеальной анестезии, выявлено не было.

Таким образом, в результате проведенного исследования удалось убедиться в возможности прижизненного получения и исследования цитологического материала многорядного столбчатого реснитчатого эпителия слизистой оболочки полости носа крыс. Несомненное преимущество – использование животных SPF-статуса, что позволяет исключить влияние экзо- и эндогенных патологических факторов, влияющих на работу цилиарного аппарата многорядного реснитчатого эпителия (воспалительные процессы верхних дыхательных путей в условиях вирусных и бактериальных персистенций, воздействия кормовых, подстилочных поллютантов и пр.).

Предлагаемый метод позволяет неоднократно получать цитологический материал слизистой оболочки полости носа и проводить динамическое исследование на одной биологической тест-системе. Значительную экономическую выгоду составляет аспект масштабных скрининговых исследований по поиску ци-

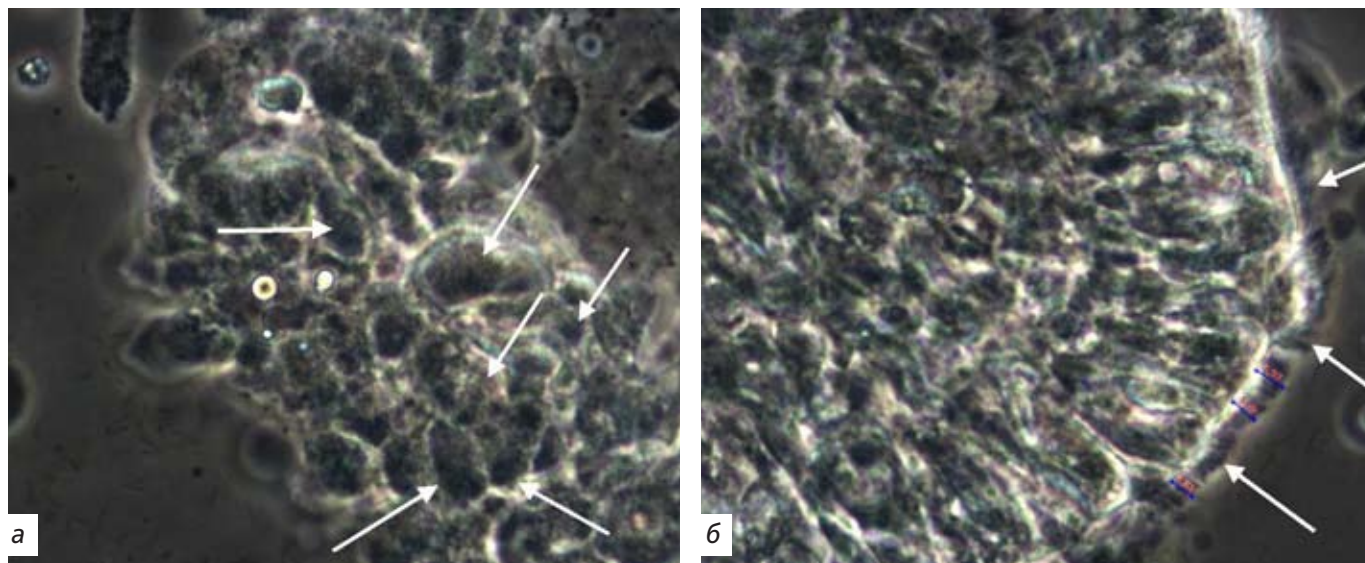


Рис. 3. Нативный материал со слизистой оболочки полости носа крыс (фазовый контраст, ув.  $\times 400$ ). а – клеточные пласты с расположением реснитчатого аппарата сверху клеток, обращенные к оптической системе (указано стрелками); в – клеточные ряды с боковым расположением цилий (указано стрелками) с измерением длины ресничек в программе

лиотропных препаратов на лимитированной группе экспериментальных животных, ограниченных только периодом естественного обновления реснитчатого эпителия верхних дыхательных путей.

Следующим этапом методической разработки планируется решение проблемы с оптимальной пространственной ориентацией клеточных рядов для проведения морфометрии. На данный момент исследователь лишен возможности регулировать положение цилиарного аппарата в пространстве по отношению к оптической системе. В ходе браш-биопсии получают обширные клеточные пласты или наслаивающиеся ряды клеток, что ограничивает возможности полноценного морфометрического исследования, требующего расположения цилий в сагиттальной плоскости («в профиль») (рис. 3). В перспективе предстоит разработать методическое обеспечение для атравматичной диссекции полученных эпителиальных пластов на однослойные ряды клеток в условиях *in vitro* и ориентации клеток в положение, оптимальное для анализа функционального состояния цилиарного аппарата, с возможностью более детального изучения состояния эпителиоцитов.

Интерес к разработке доступного метода прижизненной оценки цилиарной активности на крысах подкрепляется данными литературы, в которых морфологическая картина и морфометрические показатели многорядного столбчатого реснитчатого эпителия крыс наиболее соответствуют параметрам, полученным у человека [4, 10–12]. Кроме того, прижизненное изучение мукоцилиарной системы на таких грызунах как, лабораторные мыши, востребовано не менее, но подбор инструмента для малых размеров носовых ходов остается пока технически неразрешенной задачей.

## Заключение

По результатам изложенного сделаны следующие выводы:

1. Браш-биопсия слизистой оболочки носа у крыс – технически легко выполняемая, малоинвазивная и низкотравматичная процедура.
2. Качество прижизненно полученного цитологического материала многорядного столбчатого реснитчатого эпителия слизистой оболочки полости носа в абсолютной степени зависит от условий разведения и содержания животных в виварии. Использование животных SPF-статуса становится ключевым условием для проведения исследований, связанных с изучением органов дыхательной системы.
3. Бесспорное преимущество метода – возможность динамического исследования на одной биологической тест-системе.

## Литература.

1. Inoue D., Furubayashi T., Ogawara K., Kimura T., Higaki K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A., Higashi Y. In vitro evaluation of nasal mucociliary clearance using excised rat nasal septum. *Biol Pharm Bull* 2012; 35(6): 889–894.
2. Inoue D., Furubayashi T., Ogawara K., Kimura T., Higaki K., Shingaki T., Kimura S., Tanaka A., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A., Higashi Y. In vitro evaluation of ciliary beat frequency of the rat nasal epithelium using a high-speed digital imaging system. *Biol Pharm Bull* 2013; 36(6): 966–973.
3. Rusznak C., Devalia J.L., Lozewicz S., Davies R.J. The assessment of nasal mucociliary clearance and the effect of drugs. *Respir Med* 1994; 88: 89–101.
4. Delmotte P., Sanderson M.J. Ciliary beat frequency is maintained at a maximal rate in the small airways of mouse lung slices. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 110–117.
5. Li D., Shirakami G., Zhan X., Johns R.A. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 175–181.
6. Fernandes C.A., Vanbever R. Preclinical models for pulmonary drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6(11): 1231–1245.
7. Laube B.L. The expanding role of aerosols in systemic drug delivery, gene therapy, and vaccination. *Respir Care* 2005; 50(9): 1161–1174.
8. Harkema J.R., Carey S.A., Wagner J.G. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 252–269.
9. Uraih L.C., Maronpot R.R. Normal histology of the nasal cavity and application of special techniques. *Environ Health Perspect* 1990; 85: 187–208.
10. Chilvers M.A., O'Callaghan C. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax* 2000; 55: 314–317.
11. Kempeneers C., Seaton C., Chilvers M.A. Variation of ciliary beat pattern in three different beating planes in healthy subjects. *CHEST* 2017; 151(5): 993–1001.
12. Chilvers M.A., Rutman A., O'Callaghan C. Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. *Thorax* 2003; 58: 333–338.