

УДК 616.231:612.592:577.152.313

DOI: 10.12737/article\_5a1f7327d79570.66878052

**ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ КИСЛОЙ И ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗ  
В ЭПИТЕЛИИ ТРАХЕИ ПРИ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ****С.С.Целуйко, Н.П.Красавина**

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95*

**РЕЗЮМЕ**

Цель исследования – изучить ферментативную активность гидролитических ферментов в эпителии трахеи крыс при общем охлаждении организма. Анализ полученных данных показал, что при ежедневном трехчасовом общем холодном воздействии на кроликов в течение 28 дней при температуре минус 25-28°C обнаружено значительное усиление активности кислой фосфомоноэстеразы на апикальном полюсе эпителиальных клеток слизистой оболочки трахеи. В этих экспериментальных условиях щелочная фосфатаза проявляет свою активность в базальном полюсе эпителия и в гранулах мигрирующих тучных клеток через эпителий в просвет трахеи. Есть основания полагать, что продолжение неблагоприятного действия низких температур приведёт к глубоким и стойким нарушениям ферментативной активности гидролитических ферментов эпителиоцитов, выраженной дестабилизации мембран лизосом и развитию деструктивных изменений в реснитчатых эпителиоцитах.

*Ключевые слова: кислая и щелочная фосфатаза, многорядный реснитчатый эпителий трахеи, тучные клетки, холодное воздействие.*

**SUMMARY****HISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF ACID  
AND ALKALINE PHOSPHATASE IN TRACHEA  
EPITHELIUM AT COLD EXPOSURE****S.S.Tseluyko, N.P.Krasavina**

*Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str.,  
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

The aim of the research is to study the activity of hydrolytic enzymes in epithelium of rats' trachea under total cooling of the organism. The analysis of the obtained data showed that with a daily three hour total cold exposure of rabbits during 28 days at the temperature of -25~-28°C, a significant increase in the activity of acidic phosphomonoesterase at the apical pole of the epithelial cells of the tracheal mucosa was observed. Under these experimental conditions, alkaline phosphatase is active in the basal pole of the epithelium and in granules of mast cells migrating through the tracheal epithelium into the lumen of the trachea. There are reasons to believe that the continuation of the adverse effect of low temperatures leads to deep and persistent disturbance of the enzymatic organization of hydrolytic

**enzymes of epithelial cells, pronounced destabilization of lysosome membranes and the development of destructive changes in ciliate epitheliocytes.**

*Key words: acid and alkaline phosphatase, pseudostratified ciliated epithelium of the trachea, mast cells, cold exposure.*

Большое внимание, которое уделяют исследователи изучению состояния отдельных ферментов и ферментных систем при нормальных и патологических процессах в организме, позволяют выявить наиболее ранние этапы нарушения обмена, ведущие в дальнейшем к морфологическим изменениям микроструктур, обнаруживаемых обычными гистохимическими и электронно-микроскопическими методами. Ферменты обладают строгой специфичностью к веществам, на которые они воздействуют (субстрат) и проявляют активность при определённых условиях температуры и реакции (рН) среды (нейтральная, кислая, щелочная) [1, 6, 11]. Ферменты, участвующие в расщеплении фосфорных эфиров, получившие название гидролитических, способны гидролизировать эфиры фосфорной кислоты [1, 2]. Гистохимическое исследование щелочной и кислой фосфатаз показывает, что они являются как в цитоплазме, так и в ядрах клеток [5, 8, 9, 12]. Было высказано предположение [3, 4, 9], что щелочная фосфатаза играет важную роль в переносе фосфора в щелочной среде (рН 8,6-10,1) через клеточные мембраны клеток, являясь маркером плюрипотентных и стволовых клеток. В то время как кислая фосфатаза, обладающая широкой субстратной специфичностью, катализирует расщепление сложноэфирных связей с образованием свободного ортофосфата по спектру активности близкой к щелочной фосфатазе, но от которой отличается иным действием на серосодержащие эфиры с оптимумом рН 4,7-6,0 [6, 9]. Кислая фосфатаза сосредоточена в основном в лизосомах и частично в комплексе Гольджи [12]. Световая и электронная микроскопия показали, что этот фермент перемещается из лизосом в комплекс Гольджи, а затем во внеклеточное пространство, где происходит процесс активации в кислой среде. Механизм выделения ферментов из лизосом и комплекса Гольджи в реснитчатом эпителии трахеи остаётся на сегодняшний день малоизученным явлением. Совсем отсутствуют сведения в тех случаях, когда эпителиальные клетки трахеи подвергаются холодным воздействиям.

Цель исследования – изучить ферментативную активность гидролитических ферментов в эпителии трахеи крыс при общем охлаждении организма.

### Материалы и методы исследования

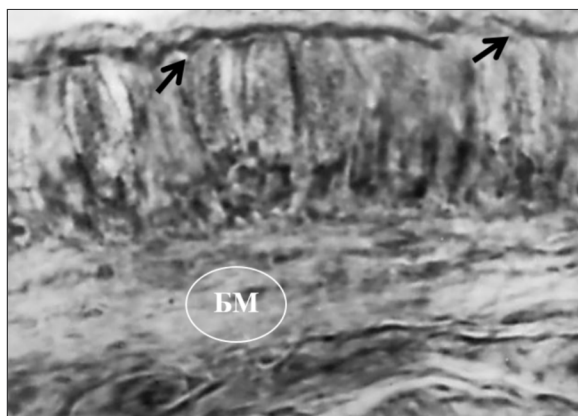
Исследование проведено на 20 белых беспородных половозрелых кроликах - самцах. При исследовании животные были разделены на 2 группы: первая (контрольная) состояла из 10 животных, которые содержались в условиях вивария в течение всего эксперимента при температуре 22°C. Вторая группа, состоящая из 10 животных, подвергалась ежедневному 3-х часовому общему холодному воздействию в течение 28 дней при температуре минус 25-28°C.

Протокол экспериментальной части исследования на этапах содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из опыта соответствовал принципам биологической этики, изложенным в Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), Приказе МЗ СССР №755 от 12.08.1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», Приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Крыс декапитировали с соблюдением требований гуманности согласно Приложению №4 «О порядке проведения эвтаназии (умерщвления) животного» к Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к Приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977) с целью получения комплекса органов дыхательной системы. Исследование одобрено Этическим комитетом Амурской государственной медицинской академии.

Объектом нашего исследования был каудальный отдел слизистой оболочки трахеи. Взятые образцы тканей использовали для изготовления срезов на замораживающем микротоме, толщиной 25-30 мкм с последующим изучением активности кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2), выявленной по свинцовому методу J.L.Ericsson, В.F.Trump и щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1), выявленной по методу Miyahara для электронной гистохимии [3]. Исследование ультратонких срезов проводили на электронном микроскопе просвечивающего типа Tescna G2 Spirit Twin (Голландия).

Для изучения на светооптическом уровне реакции



на кислую фосфомоноэстеразу и щелочную фосфатазу применяли модифицированный сульфидный метод Гомори (G.Gomori, 1956), где образующийся сульфид свинца исследовали при различных концентрациях водородных ионов инкубационной среды от рН 4,7 до 6,7, с интервалом 0,5 единиц рН. Для выявления щелочной фосфатазы рН инкубационного раствора составлял 9,2.

### Результаты исследования

**Щелочная фосфомоноэстераза.** При изучении в световой микроскопии активность щелочной фосфатазы в слизистой и подслизистой оболочках трахеи выражена слабо. Положительная реакция выявляется на апикальной поверхности эпителия в виде несплошной тонкой чёрной полосы. В зоне, прилегающей к базальной мембране, реакция слабо положительная: здесь небольшое число мелких гранул, расположенных широкой полосой (рис. 1).

При электронной микроскопии активность щелочной фосфатазы выявляется в виде мелких гранул в апикальной зоне клеток эпителия слизистой оболочки трахеи. Гранулы равномерно располагаются на поверхности ресничек и микроворсинок (рис. 2).

Между ресничками и микроворсинками выявляются тонкие нити гликокаликса, в которых отмечена положительная реакция на щелочную фосфомоноэстеразу. Гранулы реакции на щелочную фосфомоноэстеразу содержатся в значительном количестве в мембранах базальных клеток, чётко отграничивая их друг от друга. Положительная реакция выявлена в базальной мембране слизистой оболочки трахеи, здесь преимущественно располагаются гранулы среднего и мелкого размеров. Интенсивно маркируются гранулы тучных клеток (рис. 3 А, Б, В).

При ежедневном трёхчасовом охлаждении кроликов в течение 28 дней значительное усиление активности щелочной фосфомоноэстеразы обнаружено в базальном полюсе эпителиальных клеток слизистой оболочки трахеи. Гранулы реакции локализуются в виде широкой чёрной полосы в базальной мембране эпителия (рис. 4). Обращает внимание выявление реакции на щелочную фосфатазу в гранулах тучных клеток скапливающихся около базальной мембраны и затем проникающих в эпителиальный пласт (рис. 4 Б, В).

*Рис. 1.* Слизистая оболочка трахеи интактного кролика. На апикальной поверхности эпителиальных клеток продукты реакции на щелочную фосфомоноэстеразу выявляются в виде несплошной тонкой чёрной полосы (стрелки). В зоне базальной мембраны (БМ) фермент менее активен. Щелочная фосфатаза по Гомори, рН 9,2. Увеличение: 600



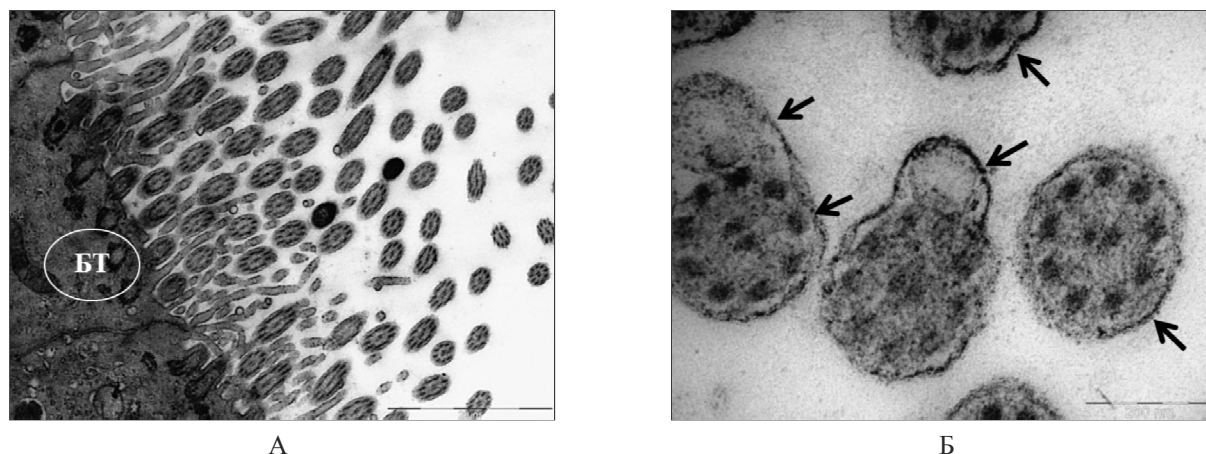


Рис. 2. Слизистая оболочка трахеи intactного кролика. На апикальной поверхности эпителиальных клеток продукты реакции на щелочную фосфоноэстеразу выявляются в мембране ресничек (стрелки) и базальных тельцах реснитчатых клеток (БТ). Заливка: аралдит, эпон. Окраска: уранил ацетат, цитрат свинца. Увеличение: А – 23000, В – 200000.

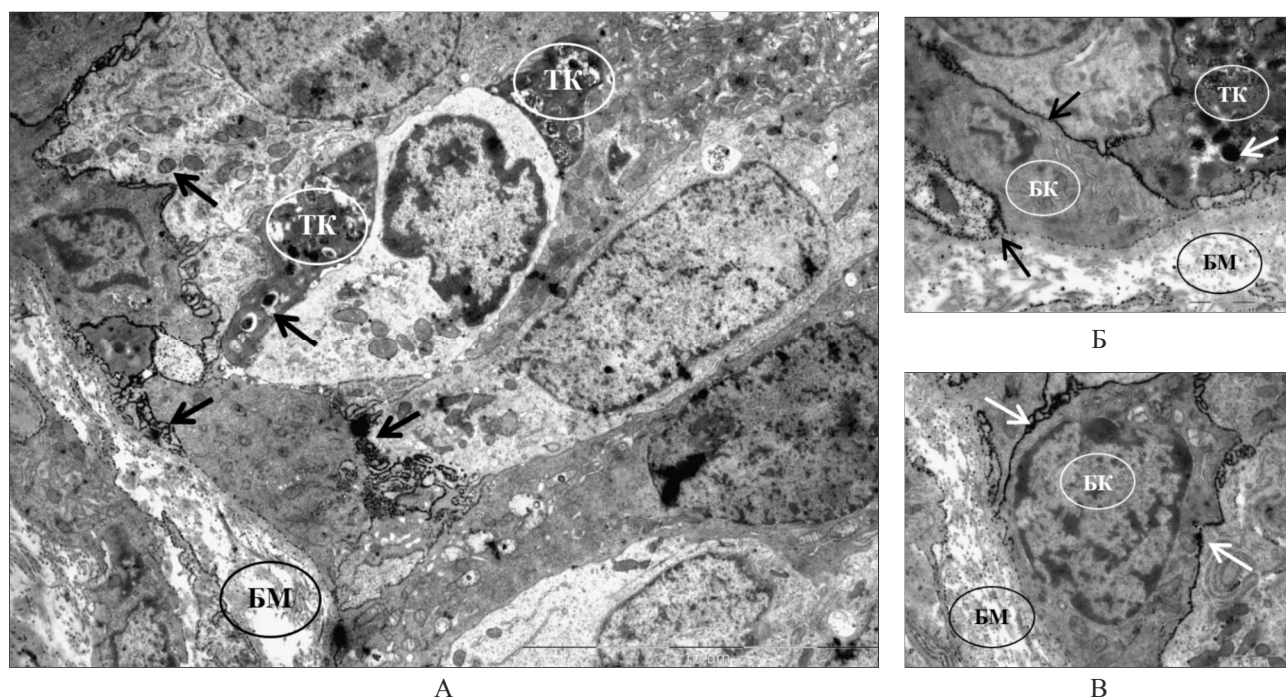


Рис. 3. Слизистая оболочка трахеи intactного кролика. На базальном полюсе эпителиальных клеток продукты реакции на щелочную фосфоноэстеразу выявляются в мембранах базальных (стволовых) клеток (БК) и гранулах тучных клеток (ТК). Гранулы сульфида свинца (стрелки) интенсивно маркируют апикальные и боковые поверхности базальных клеток (Б, В). В базальной мембране (БМ) и на границе со стволовыми клетками количество гранул реакции незначительное. Заливка: аралдит, эпон. Окраска: уранил ацетат, цитрат свинца. Увеличение: А – 6000; Б, В – 23000.

**Кислая фосфоноэстераза.** Кислая фосфоноэстераза выявляется при освобождении в процессе гидролиза фосфата и взаимодействия его с азотнокислым серебром в кислой среде, в результате чего образуются нерастворимые соли свинца. Интенсивность реакции определяется по количеству гранул и их распределению в клетках. Кислая фосфоноэстераза в эпителии трахеи intactных кроликов в основном локализуется в лизосомах (рис. 5).

Для определения набора изоферментов мы использовали инкубационные растворы с различными значениями рН. При рН 5,2 активность кислой

фосфоноэстеразы в слизистой оболочке трахеи в основном выявляется в апикальной зоне эпителия. Усиление реакции наблюдается при рН инкубационного раствора 5,7 (рис. 6). На базальном полюсе эпителиальных клеток гранулы мелкие и в небольшом количестве. При рН 6,2 резко возрастает активность и увеличивается количество гранул сульфида свинца на апикальном полюсе эпителия. При приближении инкубационного раствора к нейтральному (рН 6,7) количество гранул гистохимической реакции на кислую фосфатазу резко уменьшается, вплоть до полного отсутствия в слизистой оболочке.



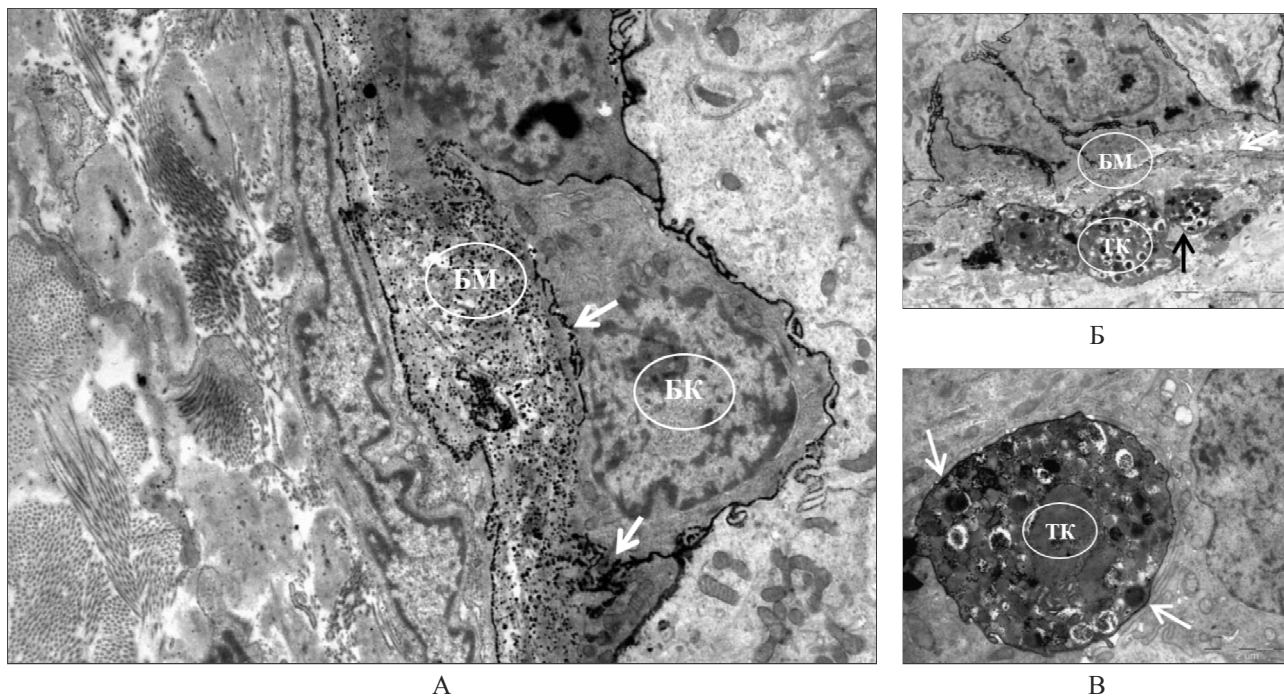


Рис. 4. Слизистая оболочка трахеи кролика при действии холода. В базальном полюсе эпителиальных клеток продукты реакции на щелочную фосфоэстеразу выявляются в базальной мембране (БМ). Гранулы сульфида свинца (стрелки) интенсивно маркируют в тучных клетках (Б, В). Заливка: арадит-эпон. Увеличение: А – 15000; Б – 8000, В – 23000.

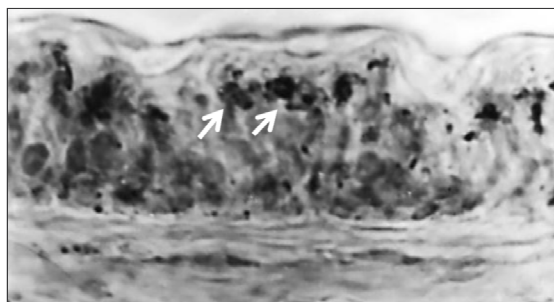


Рис. 5. Слизистая оболочка трахеи интактного кролика. В апикальной зоне цитоплазмы эпителия выявляются крупные гранулы сульфида свинца (стрелки). На базальном полюсе гранулы мелкие и единичные. Кислая фосфоэстераза по Гомори, рН 5,7. Увеличение: 400.

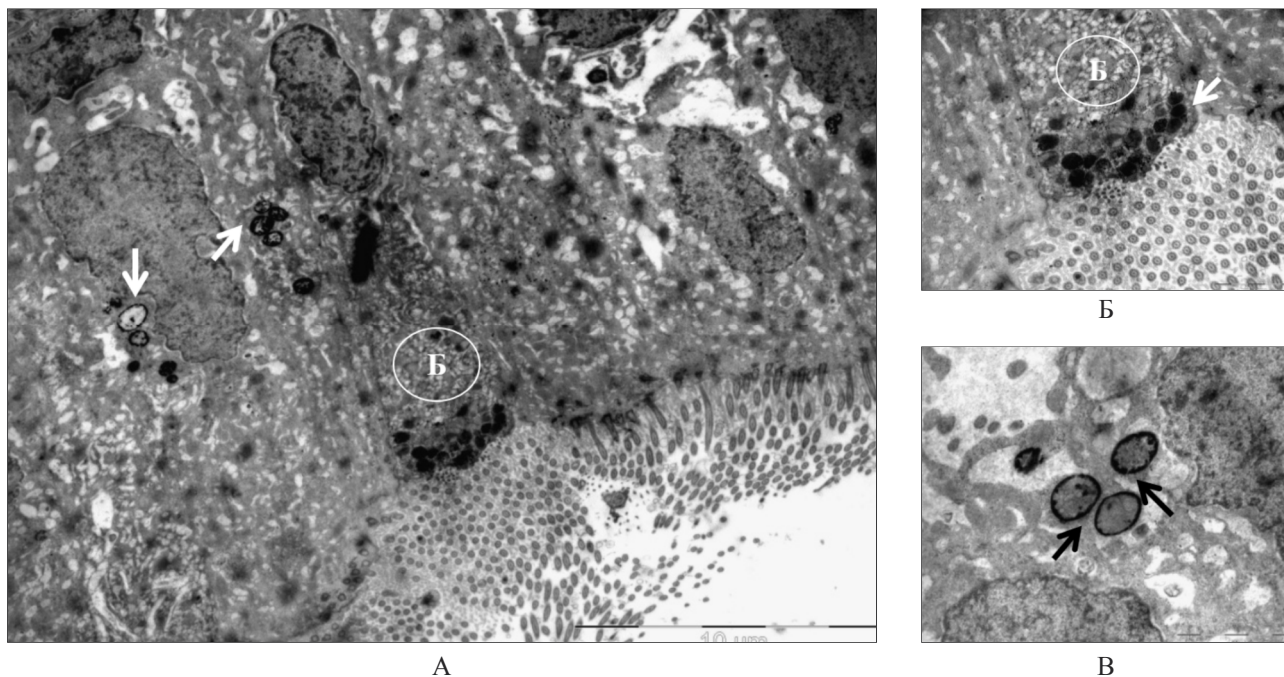


Рис. 6. Слизистая оболочка трахеи интактного кролика. Гранулы, отражающие активность кислой фосфатазы выявляются в лизосомах (стрелки) и апикальном полюсе бокаловидных клеток (Б). Кислая фосфоэстераза по методу J.L.Ericsson, V.F.Trump рН 5,7. Заливка: арадит-эпон. Увеличение: А – 6000; Б – 23000; В – 60000.



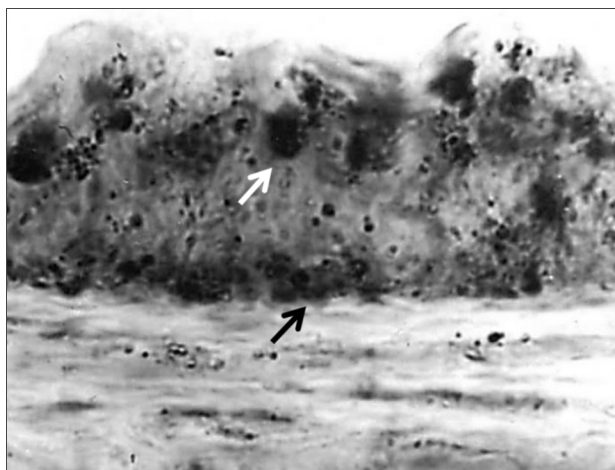


Рис. 7. Слизистая оболочка трахеи кролика. Охлаждение организма в течение 28 дней при минус 28°C. Отмечено значительное увеличение сульфида свинца на апикальном и в меньшей степени базальном полюсах эпителиальных клеток (стрелки). Кислая фосфоэстераза по Гомори рН 5,7. Увеличение: 630.

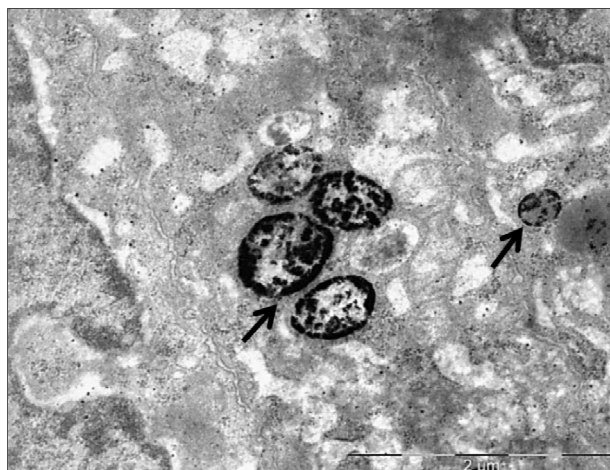
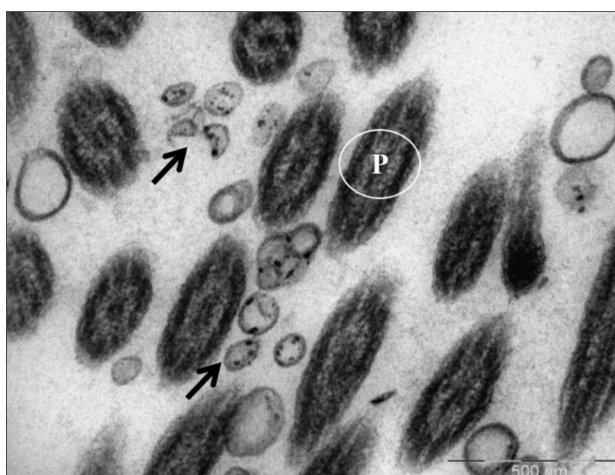


Рис. 8. Электронограмма эпителия слизистой оболочки трахеи кролика. Охлаждение организма в течение 28 дней при минус 28°C. Размер лизосом, количество гранул сульфида свинца в них значительно варьирует. Заливка: аралдит-эпон. Кислая фосфоэстераза по методу J.L.Ericsson, В.F.Trump рН 5,7. Увеличение: 23000.



А



Б

Рис. 9. Слизистая оболочка трахеи кролика при действии холода. Большое количество продуктов гистохимической реакции располагается преимущественно в апикальном полюсе клеток эпителия в микровезикулах (стрелки) отпочковывающихся от апикальной плазмалеммы реснитчатых клеток, микроворсинок (М) и ресничек (Р). Кислая фосфоэстераза по методу J.L.Ericsson, В.F.Trump рН 5,7. Заливка: аралдит-эпон. Увеличение: А – 60000, Б – 100000.

При ежедневном трёхчасовом охлаждении кроликов в течение 28 дней обнаружено значительное усиление активности кислой фосфоэстеразы на апикальном полюсе реснитчатого эпителия трахеи (рис. 7).

При рН 5,2 в апикальном полюсе эпителиальных клеток слизистой оболочки трахеи возрастает число гранул сульфида свинца. Размер гранул увеличивается, некоторые из них сливаются. В базальном полюсе гранулы мелкие, число их увеличивается незначительно. При рН 5,7 значительно возрастает количество сливающихся гранул сульфида свинца на апикальном полюсе эпителиальных клеток (рис. 7).

На электронограммах мы отметили увеличение количества лизосом от 8 до 16 в апикальном полюсе рес-

нитчатых клеток, тогда как в контроле их количество не превышает от 2 до 6. Размер лизосом, количество гранул сульфида свинца в них значительно варьирует (рис. 8).

При рН 6,2 инкубационного раствора число мелких гранул сульфида свинца увеличивается в апикальном полюсе эпителиальных клеток. При рН 6,7 наибольшее увеличение числа гранул сульфида свинца выявляется в базальном полюсе эпителиальных клеток слизистой оболочки трахеи.

Усиленная секреторная функция реснитчатых эпителиоцитов при холодовом воздействии выражается в отпочковании от ресничек и микроворсинок мелких везикул, выходящих затем в просвет трахеи и сохраняющих на своей поверхности и внутри весь набор кислых

гидролитических ферментов. Нами выявлено наличие кислой фосфатазы в микровезикулах отпочковывающихся от апикальной плазмалеммы реснитчатых клеток, микроворсинок и ресничек (рис. 9).

#### Обсуждение результатов исследования

Температура является важнейшим фактором окружающей среды, воздействующим на человека и животных. Действие низких температур на биологические объекты зависит от степени филогенетической зрелости организма и реализуется посредством различных механизмов в условиях *in vitro* и *in vivo* [6]. Степень состоятельности защитных компенсаторно-приспособительных механизмов дыхательных путей зависит от двигательной активности мукоцилиарного конвейера. Анализ полученных данных показал, что в условиях длительного действия низкой температуры наблюдается усиление, особенно в апикальном полюсе клеток эпителия, активности гидролитических ферментов, имеющих оптимум действия в наиболее кислой среде (рН 5,2; 5,7). Исследованиями С.С.Линтон [10] и Б.И.Псахис [7] установлено, что жизнеспособность реснитчатых клеток и вместе с тем подвижность ресничек мерцательного эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей зависят от рН среды, которая может снижаться даже до 4,6 – 6,5. Таким образом, увеличение продуктов гистохимической реакции на кислую фосфатазу при холодовом воздействии подтверждает закисление среды функционирования ресничек и микроворсинок.

В этих экспериментальных условиях щелочная фосфатаза проявляет свою активность в базальном полюсе эпителия. По данным морфологических исследований [8] при остром охлаждении в эпителии резко активизируется синтез мукополисахаридов бокаловидными клетками и железами в подслизистой основе, в результате чего возрастает роль щелочной фосфатазы в переносе веществ через мембраны. В условиях длительного холодового воздействия выявлено увеличение продуктов гистохимической реакции на щелочную фосфатазу в гранулах тучных клеток, мигрирующих через эпителий в просвет трахеи. Этот механизм является универсальным и обеспечивает регуляцию процесса регенерации функционально отживших эпителиальных клеток. Повышение миграции тучных клеток при длительном холодовом воздействии в данном случае связано с передачей информационного воздействия на стволовые клетки через жидкую среду, которая уменьшает количество малодифференцированных клеток в эпителии слизистой оболочки трахеи [9].

Есть основания полагать, что продолжение неблагоприятного действия низких температур приводит к глубоким и стойким нарушениям ферментативной организации эпителиоцитов, выраженной дестабилизации их мембран и развитию деструктивных изменений в ресничках. Таким образом, активность гидролитических ферментов может быть одним из критериев в оценке работы мукоцилиарного аппарата.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев А. К. Гистохимия щелочной и кислой фосфатаз человека в норме и патологии. Л.: Медицина, 1969. 144 с. URL: <http://tedxlviv.com/gistohimija-shhelochnoj-i-kisloj-fosfataz/>
2. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. Учебник. М.: Медицина, 1982. 304 с. URL: <http://www.twirpx.com/file/1719069/>
3. Гайер Г. Электронная гистохимия: пер. с нем. / под ред. Н.Т.Райхлина. М.: Мир, 1974. 488 с. URL: <http://www.twirpx.com/file/252347/>
4. Гривенников И.А. Эмбриональные стволовые клетки и проблема направленной дифференцировки, Успехи биологической химии. 2008. Т.48. С.181–220. URL: <http://www.inbi.ras.ru/ubkh/48/Grivennikov.pdf>
5. Луценко М.Т., Рыжавский Б.Я., Луценко Н.В. Кислая фосфомоноэстераза. Благовещенск, 1973. 108 с.
6. Пастухов Ю.В., Максимов А.Л., Хаскин В.В. Адаптация к холоду и условиям Субарктики: проблемы термофизиологии. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2003. Т.1. 373 с.
7. Псахис Б.И. О некоторых физиологических свойствах слизистой оболочки носа и их изменении при хронических ринитах и синуситах // Вестник оториноларингологии. 1960. №5. С.58–64.
8. Целуйко С.С., Красавина Н.П., Семенов Д.А., Горбунов М.М., Чжоу С.Д., Ли Ц. Современные взгляды на вопросы пролиферации и дифференцировки стволовых клеток органов дыхания в норме и при холодовых воздействиях // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2012. Вып.45. С.98–103.
9. Danielli J.F. Cytochemistry: A Critical Approach. New York: J.Wiley & Sons Inc., 1953. 139 p.
10. Linton C.S. Infection and resistance in the upper respiratory mucosa // The Laryngoscope. 1933. Vol.43, Iss.4. P.242–273. doi: 10.1288/00005537-193304000-00002
11. McComb R.B., Bowers G.N.Jr., Posen S. Alkaline Phosphatase. New York, London: Plenum Press, 1979. 917 p. URL: <https://books.google.ru/books?isbn=1461329701>
12. Fredricsson B. The distribution of alkaline phosphatase in the rat lung // Acta Anat. 1956. № 26. P.246–256. URL: <https://doi.org/10.1159/000141099>

#### REFERENCES

1. Ageev A.K. Histochemistry of alkaline and acidic phosphatases of a human in norm and pathology. Leningrad: Meditsina; 1969. Available at: <http://tedxlviv.com/gistohimija-shhelochnoj-i-kisloj-fosfataz/> (in Russian).
2. Volkova OV, Eletskiy Yu.K. Basics of histology with histological technique (Textbook). Moscow: Meditsina; 1982. Available at: <http://www.twirpx.com/file/1719069/> (in Russian).
3. Geyer G. Electronic histochemistry. Moscow: Mir; 1974 (in Russian).
4. Grivennikov I.A. Embryonic stem cells and the prob-



lem of directed differentiation. *Uspekhi biologicheskoy khimii* 2008; 48:181–220. Available at: <http://www.inbi.ras.ru/ubkh/48/Grivennikov.pdf> (in Russian).

5. Lutsenko M.T., Ryzhavskiy B.Ya., Lutsenko N.V. Acid phosphomonoesterase. *Blagoveshchensk*; 1973 (in Russian).

6. Pastukhov Yu.V., Maksimov A.L., Haskin V.V. Adaptation to the cold and conditions of the Subarctic: the problems of thermophysiology. *Magadan*; 2003 (Vol.1). (in Russian).

7. Psakhis B.I. On some physiological properties of the nasal mucosa and their changes in chronic rhinitis and sinusitis. *Vestnik otorinolaringologii* 1960; 5:58–64 (in Russian).

8. Tseluyko S.S., Krasavina N.P., Semenov D.A., Gor-

bunov M.M., Zhou X.D., Li Q. Modern views on issues of proliferation and differentiation of respiratory stem cells in norm and cold exposure. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* 2012; 45:98–103 (in Russian).

9. Danielli J.F. *Cytochemistry: A Critical Approach*. New York: J.Wiley & Sons Inc., 1953.

10. Linton C.S. Infection and resistance in the upper respiratory mucosa. *The Laryngoscope* 1933; 43(4):242–273. doi: 10.1288/00005537-193304000-00002

11. McComb R.B., Bowers G.N.Jr., Posen S. *Alkaline Phosphatase*. New York, London: Plenum Press; 1979. doi: 10.1007/978-1-4613-2972-5

12. Fredricsson B. The distribution of alkaline phosphatase in the rat lung. *Acta Anat.* 1956; 26:246–256. Available at: <https://doi.org/10.1159/000141099>

Поступила 05.10.2017

Контактная информация

Сергей Семенович Целуйко,

доктор медицинских наук, профессор,

заведующий кафедрой гистологии и биологии,

Амурская государственная медицинская академия,

675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95.

E-mail: [agma.agma@yandex.ru](mailto:agma.agma@yandex.ru)

Correspondence should be addressed to

Sergey S. Tseluyko,

MD, PhD, DSc, Professor,

Head of Department of Histology and Biology,

Amur State Medical Academy,

95 Gor'kogo Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: [agma.agma@yandex.ru](mailto:agma.agma@yandex.ru)