

© М. А. Сырцова, 2016
УДК 611.24.018:599.323.4

М. А. Сырцова

НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ЛЕГКОГО У КРЫСЫ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — профессор РАН Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Исследование выполнено на беспородных крысах-самцах (n=20). Целью работы являлось выявление всех клеток легкого, содержащих нитроксидсинтазу (NOS), и определение их тканевой принадлежности на основании изучения структуры и локализации, для чего был использован подход, позволяющий с помощью одной иммуноцитохимической реакции выявлять все три изоформы NOS. Из полученных результатов следует, что синтез оксида азота в легком может осуществляться как эпителиоцитами респираторного отдела легкого, эндотелием артерий и вен, альвеолярными макрофагами, так и особыми нитроксид-иммунопозитивными структурами, не описанными ранее, напоминающими по своей организации нейроэпителиальные тельца, тканевая принадлежность и происхождение которых нуждаются в дальнейшем изучении. Полученные данные подтверждают возможность при постановке только одной иммуноцитохимической реакции выявлять все клетки, содержащие различные изоформы NOS.

Ключевые слова: легкие, иммуногистохимия, оксид азота

Оксид азота (NO) обладает высокой биологической активностью и синтезируется в организме животного и человека различными клетками при помощи фермента нитроксидсинтазы (NOS). В настоящее время идентифицированы три основных изоформы NOS, экспрессируемых в организме млекопитающих: нейрональная, индуцибельная и эндотелиальная, которые обозначаются как тип I (NOS-1, или nNOS), тип II (NOS-2, или iNOS) и тип III (NOS-3, или eNOS) согласно первичному источнику выделения: нервная ткань, макрофаги и эндотелиоциты [7, 8, 12]. Каждая изоформа кодируется собственным геном [7, 13]. Изоформы различаются первичной структурой белковой части и механизмами активации фермента. Нейрональная и макрофагальная формы NOS находятся в гиалоплазме клеток, а эндотелиальная — связана с внутриклеточными мембранными структурами [7]. Нейрональная и эндотелиальная изоформы фермента постоянно присутствуют в клетках и называются конститутивными. Индуцибельная NOS (NOS-2) появляется в клетках только через несколько часов после индукции бактериальными эндотоксинами и медиаторами воспаления [5].

В настоящее время активно изучается роль NO в регуляции функций легких в норме и при патологии. Считается, что NO участвует в важных физиологических процессах, таких как регуляция тонуса сосудов легкого, бронходилатация, мукоцилиарный транспорт, а также в процес-

сах местного воспаления и иммунной защиты [6]. Предполагается, что в респираторном тракте представлены все 3 типа NOS [7]. В эндотелии сосудов легкого синтез NO может осуществляться посредством конститутивной формы NOS. Показано, что среди нервных волокон, иннервирующих различные структуры легких, присутствуют нитроксидергические [10]. Доказано существование в макрофагах активного NO, образующего при участии индуцибельной NOS [5, 8].

Имеются много работ, посвященных изучению функциональных особенностей различных типов NOS и связи между выработкой NO и гиперэкспрессией NOS при патологии [7, 8]. При этом сохраняется неопределенность относительно тканевых элементов, способных к синтезу NO как в норме, так и при патологии.

Цель данного исследования — выявление клеток в легком, содержащих NOS, и определение их тканевой принадлежности на основании изучения структуры и локализации.

Материал и методы. Исследование выполнено на беспородных крысах-самцах массой от 210 до 230 г (n=20). Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Животных выводили из эксперимента посредством декапитации под глубоким наркозом препаратами «Золитил-100» (Virbac, Франция) и «Ксила» (Interchemie, Нидерланды) с дальнейшим взятием материала для проведения гистологического исследо-

Сведения об авторе:

Сырцова Марина Александровна (e-mail: marina.syrzova@mail.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

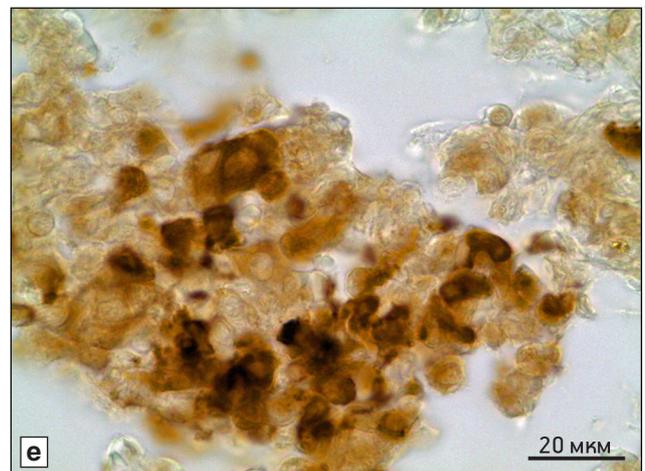
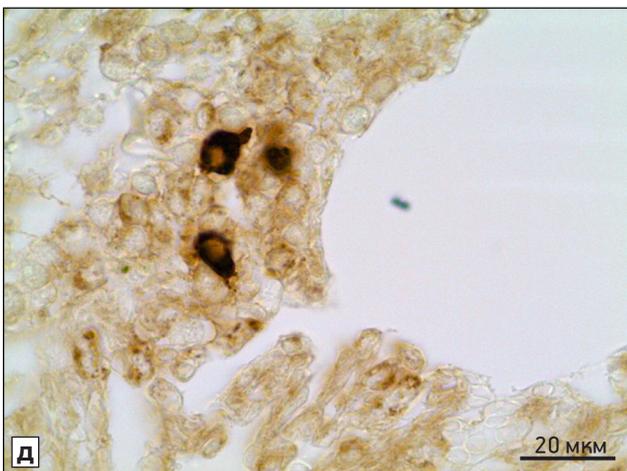
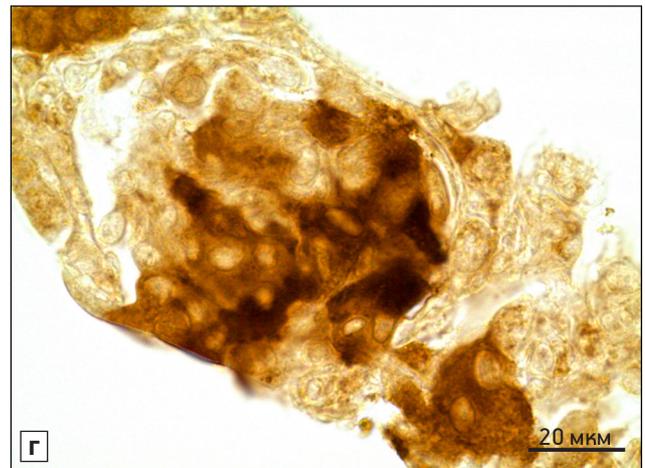
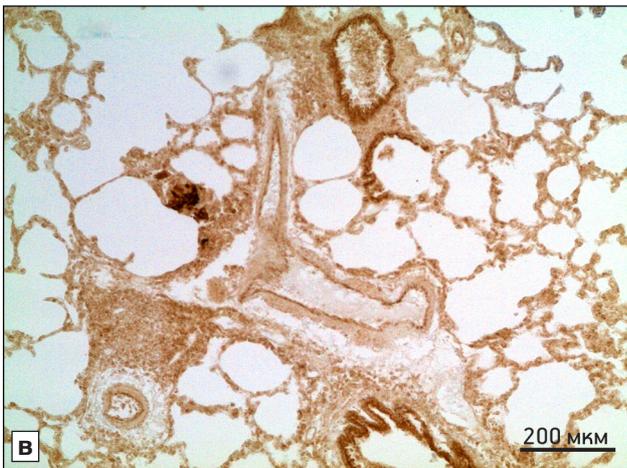
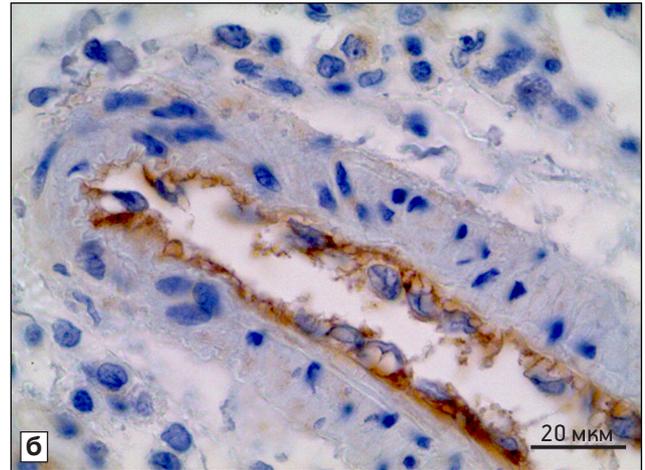
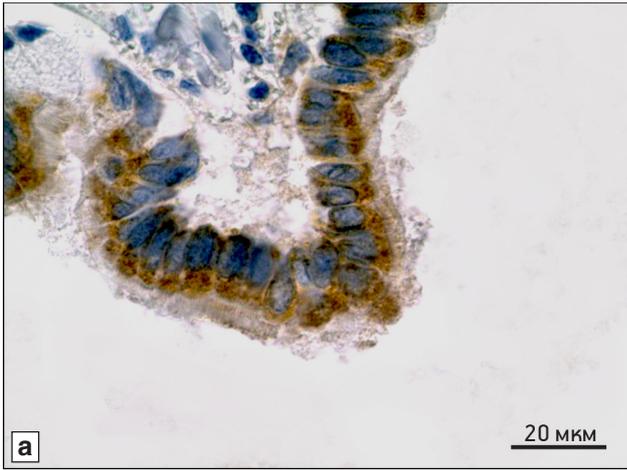
вания. Морфологическому исследованию во всех случаях подвергали левое легкое. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, обезвоживали и заливали в парафин согласно общепринятой методике с использованием автоматической системы карусельного типа для гистологической проводки ткани, модель STP 120 (Thermo Scientific, Германия). Из полученных блоков готовили срезы толщиной 5 мкм на микротоме Leica RM2125RT (Leica, Германия), которые наклеивали на стекла с адгезивным покрытием Histobond (Marienfeld, Германия). Часть срезов окрашивали гематоксилином—эозином. В качестве положительного контроля был использован головной мозг крысы, содержащий стриатум, для которого характерно постоянное присутствие NO-ергических нейронов. После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации проводили тепловое демаскирование антигена в буфере S1700 (Dako, Дания) и блокирование эндогенной пероксидазы в 3% растворе перекиси водорода. Для блокирования неспецифических сайтов связывания антигена применяли раствор Protein block (Spring Bioscience, США). NO-ергические клетки выявляли при помощи поликлональной кроличьей сыворотки (Anti-Nitric oxidesynthase-universal, uNOS; 1:500) против общего для всех трех форм фрагмента NOS. Для выявления комплекса антиген—антитело применяли набор вторичных антител HRP Conjugate из набора Reveal Polivalent HRP DAB Detection System SPD-015 (Spring Bioscience, США). Для визуализации продукта иммуноцитохимической реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов окрашивали квасцовым гематоксилином и заключали в перманентную среду Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, США). Полученные препараты исследовали под микроскопом Leica DM750 (Leica, Германия), фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Измеряли диаметр иммунопозитивных клеток и их скоплений с использованием программы LAS EZ (Leica, Германия).

Результаты исследования. Анализ материала, окрашенного гематоксилином—эозином, показал, что легкие не имеют признаков патологии. Во всех исследованных случаях иммуноцитохимическая реакция прошла селективно, при слабой интенсивности фона. Специфическая реакция определялась в эпителии бронхов и по внутреннему периметру сосудов (*рисунок*). Отдельные окрашенные клетки и группы клеток наблюдались в респираторном отделе легкого. При большом увеличении было обнаружено, что иммунопозитивным является апикальная часть клеток многорядного реснитчатого эпителия бронхов. При этом реснички, ядро и базальная часть клеток оставались неокрашенными. Продукт иммуногистохимической реакции имел мелкогранулярный характер.

Положительная реакция на NOS наблюдалась и вдоль внутренней поверхности крупных ветвей кровеносных сосудов, что соответствует расположению эндотелиоцитов в легочных венах и артериях (см. *рисунок*, б). Слабая реакция присутствовала в средней оболочке крупных сосудов легкого. Еще один вид иммунопозитивных клеток,

характерный для всех исследованных образцов, образует компактные многоклеточные структуры, расположенные в респираторной части легкого в непосредственной близости от крупных бронхов и кровеносных сосудов. Эти иммунопозитивные клетки формировали несколько вариантов скоплений: в респираторных бронхиолах группы близко расположенных клеток численностью до 25, которые могли иметь непосредственный контакт с просветом альвеолы или располагаться в составе межальвеолярных перегородок (см. *рисунок*, в–г). Размеры иммунопозитивной клетки составляли от 4,5 до 14,5 мкм. Диаметр скопления клеток превышал 50 мкм. Второй вариант скоплений — когда несколько крупных отростчатых иммунопозитивных клеток были расположены отдельно друг от друга (см. *рисунок*, д). Максимальный размер таких клеток достигал 16,5 мкм. Третий вариант — дискретно расположенные иммунопозитивные клетки, находящиеся в составе более крупных клеточных скоплений, локализованных в периферической части долек легкого (см. *рисунок*, е). Размер отдельных клеток колебался от 9 до 17 мкм. Встречались и одиночные иммунопозитивные клетки, обнаруживаемые в различных отделах легкого, в том числе и в просветах альвеол.

Обсуждение полученных данных. В настоящей работе для выявления нитроксидергических структур легкого у крысы был использован не применявшийся ранее подход — визуализация всех трех форм NOS с помощью одного типа антител, реагирующих с общими антигенными детерминантами изоформ фермента. Контрольные препараты подтвердили высокую селективность и специфичность использованной реакции по отношению к нейрональной форме NOS. Иммунопозитивные нейроны в контрольных срезах головного мозга были расположены в тех же зонах и относились к такому же морфологическому типу, что и нейроны, выявляемые при помощи реакции на нейрональную NOS и гистохимической реакцией на NADPH-диафорузу [1, 2, 11]. Внутренний положительный контроль (эндотелий кровеносных сосудов) показал, что использованные антитела действительно реагируют не только с нейрональной, но и с эндотелиальной формой NOS. Единичные иммунопозитивные клетки обнаружены в стенках альвеол в местах, соответствующих расположению альвеолярных макрофагов. Поэтому полученные результаты дают возможность при постановке только одной иммуноцитохимической реакции выявить все структуры легкого, способные синтезировать NO. Полученные результаты свидетельствуют



Нитроксид-иммунопозитивные структуры в легком крысы.

а — многоярядный реснитчатый эпителий бронхов; б — стенка легочной артерии; в, г — группы нитроксид-иммунопозитивных клеток в составе межальвеолярных перегородок; д — отростчатые иммунопозитивные клетки; е — иммунопозитивные клетки, локализованные в периферической части легкого. Иммуногистохимическая реакция на нитроксидсинтазу

о существовании NO-синтезирующих клеточных элементов в легком, относящихся к различным тканевым структурам. В крупных бронхах — это клетки в составе реснитчатого эпителия, что согласуется с данными других авторов [7, 9]. Однако в нашем исследовании показано, что NO способен синтезироваться не только в бронхах,

но и в респираторных бронхиолах. В крупных кровеносных сосудах NO-ергические структуры представлены эндотелиоцитами. Средняя оболочка сосуда, дающая слабую иммунопозитивную реакцию, также является характерным местом локализации конститутивной формы NOS.

Редко встречающиеся одиночные иммуно-позитивные клетки на фоне многочисленных иммунонегативных в различных отделах легкого, по-видимому, представляют собой альвеолярные макрофаги. Для них характерно присутствие специфической NOS типа II [5]. Эти клетки окрашены менее интенсивно, чем другие клеточные элементы, содержащие NOS. Очевидно, это связано с тем, что были исследованы легкие интактных здоровых животных. Это подтверждает концепцию о том, что высокая экспрессия индуцибельной NOS характерна только для патологического процесса. Не менее интересны дискретно расположенные иммунопозитивные клетки в периферической части долек легкого, которые ранее не были охарактеризованы.

Оказалось, что, помимо иммунопозитивных клеточных элементов в легком, обнаруженных ранее, таких как эпителиоциты бронхов [7], эндотелиоциты кровеносных сосудов [9] и альвеолярные макрофаги [5], нередко определялись скопления клеточных элементов, отличающихся как от типичных эпителиоцитов, так и от макрофагов. Отдельные компактные группы иммунопозитивных клеток напоминали нейроэпителиальные тельца [3]. Главным отличием данных компактных групп являлось не характерное место их расположения относительно бронхов, а именно локализация в составе стенки респираторных бронхиол. Несмотря на возможность существования NO-ергических нейронов в составе автономных ганглиев легкого, такие клетки в ходе настоящего исследования не были обнаружены.

Таким образом, синтез NO в легком может осуществляться как клетками, тканевая принадлежность которых не вызывает сомнений (эпителиоцитами респираторного отдела легкого, эндотелием артерий и легочных вен, альвеолярными макрофагами), так и особыми NO-иммунопозитивными структурами, напоминающими по своей организации нейроэпителиальные тельца, происхождение и тканевая принадлежность которых нуждаются в специальном исследовании.

Работа выполнена при поддержке Российского научно-го фонда (проект № 14-15-000-14).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э. Определение активности NADPH-диафоразы в головном мозгу крыс после фиксации разной длительности // Морфология. 1996. Т. 109, вып. 7. С. 76–77.
2. Коржевский Д. Э., Отеллин В. А., Григорьев И. П. и др. Иммуноцитохимическое выявление нейрональной NO-синтазы в клетках головного мозга крысы // Морфология. 2007. Т. 132, вып. 4. С. 77–80.
3. Сырцова М. А., Сухорукова Е. Г., Коржевский Д. Э. Нейроэпителиальные тельца легкого у крысы // Морфология. 2014. Т. 145, вып. 1. С. 60–62.
4. Brouns I., De Proost I., Pintelon I. et al. Neurochemical characterization of sensory receptors in airway smooth muscle: comparison with pulmonary neuroepithelial bodies // Histochem. Cell Biol. 2006. Vol. 125. P. 351–367.
5. Connelly L., Jacobs A. T., Palacios-Callender M. et al. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 26480–26487.
6. Luo S., Lei H., Qin H., Xia Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling // Curr. Pharmaceut. Design. 2014. Vol. 20. P. 3548–3553.
7. Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // Pharmacol. Rev. 1992. Vol. 43. P. 109–142.
8. Pautz A., Art J., Hahn S. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase // Nitric Oxide: Biology and Chemistry. 2010. Vol. 23, № 2. P. 75–93.
9. Shaul P. W., North A. J., Wu L. C. et al. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium // J. Clin. Invest. 1994. Vol. 94. P. 2231–2236.
10. Van Genechten J., Brouns I., Scheuermann D. W. et al. Reduced number of intrinsic pulmonary nitricergic neurons in Fawn-Hooded rats as compared to control rat strains // The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology. 2003. Vol. 272A. P. 446–453.
11. Vincent S. R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain // Neuroscience. 1992. Vol. 46, № 4. P. 755–784.
12. Wu F., Szczepaniak W. S., Shiva S. et al. Nox2-dependent glutathionylation of endothelial NOS leads to uncoupled superoxide production and endothelial barrier dysfunction in acute lung injury // Am. J. Physiol. 2014. Vol. 307. P. 987–997.
13. Xie Q., Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation // J. Leukocyte Biol. 1994. Vol. 56, № 5. P. 576–582.

Поступила в редакцию 10.07.2015

Получена после доработки 23.12.2016

NITROXIDERGIC CELLS OF THE RAT LUNG

M. A. Syrtsova

Using outbred male rats (n=20), the cells of the lung containing nitric oxide synthase (NOS) were identified. For this purpose, an immunocytochemical reaction demonstrating all three NOS isoforms was used. Tissue identification of NOS-containing cells was performed on the basis of study of their structure and localization. It was shown that nitric oxide synthesis in the lung can be carried out by the epithelial cells of the respiratory portion of the lung, the endothelium of the arteries and veins, alveolar macrophages, and special nitroxide-immunopositive structures not described previously, which resembled the neuroepithelial bodies by their organization. The tissue attribution and the origin of the latter require further study. The data obtained confirm the possibility of demonstration of all cells containing different NOS isoforms by a single immunocytochemical reaction.

Key words: *lungs, immunohistochemistry, nitric oxide*

Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg