

© А. Н. Козлова, 2017
УДК 611.24:616.8-008.615:599.323.4

А. Н. Козлова

ИЗМЕНЕНИЯ СТРОЕНИЯ ЛЕГКИХ И ЭКСПРЕССИИ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 У КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ОКСИТОЦИНА ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ СТРЕССЕ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. А. Стадников), ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

Методами световой, электронной микроскопии и иммуногистохимии на 30 крысах изучали строение легких и экспрессию в них ММП-9 при комбинированном стрессе (интратрахеальное введение *E. coli* на фоне эмоционально-болевого стресса) и введении окситоцина (ОТ) животным, подвергнутому стрессу. Исследования показали, что при комбинированном стрессе в легких происходит увеличение экспрессии ММП-9, что сопровождается активизацией миграции нейтрофилов и макрофагов, деструкцией клеток и межклеточного вещества в легких. У животных, получавших ОТ, экспрессия ММП-9 была значительно меньше и сочеталась с более низким уровнем деструктивных изменений и инфильтрации легких нейтрофилами и макрофагами. Полученные результаты позволяют сделать вывод о патогенетической роли ММП-9 при комбинированном стрессе и участии ОТ в регуляции экспрессии ММП-9 в легких.

Ключевые слова: легкие, матриксная металлопротеиназа-9, комбинированный стресс, окситоцин

Легкие как орган, имеющий контакт с внешней средой, находятся одновременно под воздействием стрессорных факторов бактериальной и небактериальной природы. Одним из звеньев, участвующих в поддержании гомеостаза легких, являются матриксные металлопротеиназы. Матриксная металлопротеиназа-9 (ММП-9) участвует в обеспечении иммунной защиты легких, элиминации антигенов и детрита, ремоделировании легких [7, 8]. Однако гиперэкспрессия ММП-9 может быть причиной повреждения тканей легких [6], что требует более подробного изучения факторов, ведущих к экспрессии и ингибированию этой протеиназы.

Механизмы защиты в органах во многом определяются функционированием гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и сопровождаются изменением уровня концентрации окситоцина (ОТ) в гипоталамусе и крови, что позволяет предположить участие ОТ в регуляции защитных реакций в организме и поддержания гомеостаза в легких. Исследования, посвященные изучению влияния ОТ на защитные механизмы в легких, отсутствуют [1].

Цель настоящего исследования — определение изменений в респираторных отделах легких у крыс и экспрессии ММП-9 при интратрахеальном введении кишечной палочки на фоне дли-

тельного эмоционально-болевого стресса (ЭБС) и влияния окситоцина на выявленные изменения.

Материал и методы. Работа выполнена на 30 белых беспородных крысах-самцах массой 250–270 г. Эксперименты с животными проводили в соответствии с «Правилами по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных» (МЗ СССР, 1877 г.; МЗ РСФСР, 1977 г.) Крысы были разделены на 3 группы. 1-ю группу составили контрольные крысы ($n=10$), которым интратрахеально вводили взвесь суточной агаровой культуры штамма кишечной палочки (*E. coli* A37) в дозе 200 млн микробных тел в 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия. Во 2-ю группу вошли крысы ($n=10$), у которых вызвали ЭБС ежедневно по 3 ч в течение 7 сут и на 8-е сутки вводили взвесь суточной агаровой культуры кишечной палочки в той же дозе. Моделирование ЭБС проводили на крысах по методике O. Desiderato и соавт. [5]. В специальной камере животных подвергали воздействию тока, избежать которого животные могли путем ухода на платформу, расположенную в центре камеры. Это приводило к выработке условного рефлекса избегания, проявляющегося постоянным нахождением крыс на платформе. Последующее нанесение ударов током через пол платформы сопровождалось формированием стрессовой реакции у животных, обусловленной как наличием конфликта между выработанным условным рефлексом избегания и безусловным болевым раздражителем, так и постоянным напряженным ожиданием электроболевого раздражения. У животных 3-й группы ($n=10$) однотипно как у крыс 2-й группы вызывали стресс и вводили внутримышечно по 0,02 ЕД ОТ (Gedeon Richter, Германия). После введения на 8-е сутки взвеси штамма культуры *E. coli* A37 продолжали ежедневно вводить внутримышечно ОТ до окончания экс-

Сведения об авторе:

Козлова Алина Николаевна (e-mail: gistolog31@mail.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6

перимента. Животных, находящихся под эфирным наркозом, декапитировали через 1 и 4 сут после контаминации бактериями.

Объектом исследования служили респираторные отделы сердечной доли правого легкого. Материал для световой микроскопии фиксировали в 10% нейтральном формалине, обрабатывали по стандартной методике, заливали в парафин и срезы окрашивали гематоксилином — эозином. Для получения полутонких и ультратонких срезов кусочки легких размером $2 \times 2 \text{ мм}^3$ фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1М фосфатном буфере и 1% растворе четырехоксида осмия, обезживляли по стандартной методике и заливали в смесь эпона и аралдита. Готовили полутонкие срезы на ультратоме LKB-5 (Швеция), окрашивали метиленовым синим и основным фуксином и подвергали морфометрическому анализу. Ультратонкие срезы последовательно контрастировали спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца. Исследование ультратонких срезов проводили на электронном микроскопе ЭМВ 100АК при увеличении от 4000 до 40 000.

Для иммуноцитохимических исследований использовали парафиновые срезы толщиной 5–6 мкм, помещенные на стекла Super frost plus. Определение матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) осуществляли поликлональными кроличьими антителами (BioGenex, США) в разведении 1:50 с применением стрептавидин-биотин-пероксидазного комплекса с 3,3-диаминобензидин-тетрагидрохлоридом (DAB) в качестве хромогена той же фирмы. Апоптоз клеток идентифицировали по фрагментации ДНК с использованием набора Apoptag (Plus Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kit-S 71010) согласно протоколу фирмы-производителя (Intergen, США). В препаратах при 1000-кратном увеличении микроскопа определяли индекс ММП-9-иммунопозитивных клеток (нейтрофилов, макрофагов, альвеолоцитов II типа) и индекс апоптоза альвеолоцитов II типа, как долю положительно окрашенных клеток от общего числа подсчитанных клеток в 10 случайно выбранных полях зрения. Морфометрические исследования на светооптическом уровне были осуществлены с использованием цифровой фотонасадки ScopeTek 500 DMC и программ Minisee и ScopePhoto. Оценку статистической значимости полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента с использованием программы Microsoft Excel 5.0a. Различия величин считались значимыми при $P \leq 0,05$ (95%).

Результаты исследования. В 1-й (контрольной) группе животных во все сроки наблюдения выявлялись морфологические изменения в респираторных отделах легких. В стенках альвеол, легочных сосудов и интерстиции наблюдалась лейкоцитарная инфильтрация с преобладанием нейтрофилов и макрофагов (таблица). Бактерии свободно располагались в альвеолярных пространствах и непосредственно на поверхности альвеолоцитов. В основном преобладал трансцеллюлярный путь миграции бактерий через структуры аэрогематического барьера. В альвеолоцитах II типа наиболее характерными изменениями были увеличение в объеме и вакуолизация цитоплазмы. Среди альвеолоцитов II типа имелись Apoptag-позитивные клетки (рис. 1, а).

В респираторных отделах легких выявлялась экспрессия ММП-9 в цитоплазме нейтрофилов и макрофагов, альвеолоцитов, эндотелиоцитов сосудов, в клетках интерстиция и межклеточном веществе. Альвеолоциты II типа, особенно увеличенные в объеме, экспрессировали ММП-9 и имели наиболее интенсивную реакцию через 1 сут после введения антигена (см. рис. 1, б).

У животных 2-й группы на световом и электронно-микроскопическом уровнях было выявлено, что альтеративные изменения в легких проявляются в большей степени. Лейкоцитарные инфильтраты располагались вокруг бронхиол, легочных сосудов, просвете альвеол и интерстиции. На поверхности стенок альвеол встречались реактивно измененные макрофаги (рис. 2).

Количество нейтрофилов в просвете альвеол и интерстиции респираторных отделов легких по сравнению с таковым в контроле было увеличено через 1 сут после введения антигена и к 4-м суткам снижалось. Количество макрофагов в респираторных отделах было больше по сравнению с контрольными показателями (см. таблицу).

Относительное содержание нейтрофилов и макрофагов в ацинусах легких у крыс при инфицировании *E. coli* на фоне эмоционально-болевого стресса и введения окситоцина

Группа животных	Сроки опыта, сут	Нейтрофилы	Макрофаги	ММП-9-позитивные	
				нейтрофилы	макрофаги
1-я	1-е	7,1±0,6	8,2±1,4	22,31±2,8	20±3
	4-е	6,1±0,7	7,1±1,1	20±3	61±4
2-я	1-е	9,7±0,8*	21,6±1,8*	65±4*	29±3*
	4-е	4,4±0,5*	25,5±1,9*	18±3	26±4*
3-я	1-е	6,4±0,6**	16,6±1,5**	10,2±2,8**	24±4*
	4-е	3,3±0,4*	16,4±1,6**	8,1±2,2**	12,2±2,2**

* Различия по сравнению с показателями в контроле значимы при $P < 0,05$.

** Различия по сравнению с показателями у животных 2-й подопытной группы значимы при $P < 0,05$.

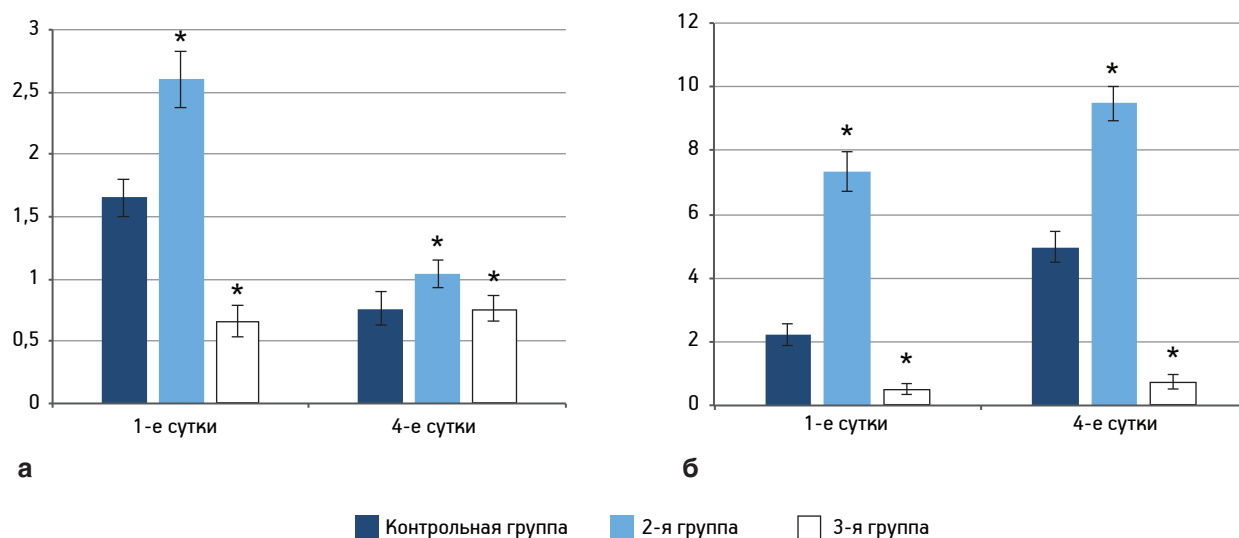


Рис. 1. Содержание альвеолоцитов II типа с положительной Арортгаг-реакцией (а) и экспрессирующих ММП-9 (б) в лёгких у крыс при интратрахеальном введении *E. coli* на фоне эмоционально-болевого стресса и влияния окситоцина.

По горизонтальной оси — срок после инфицирования *E. coli*; по оси ординат — относительное содержание клеток (%). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. * Различия по сравнению с показателями в контроле значимы при $P < 0,05$

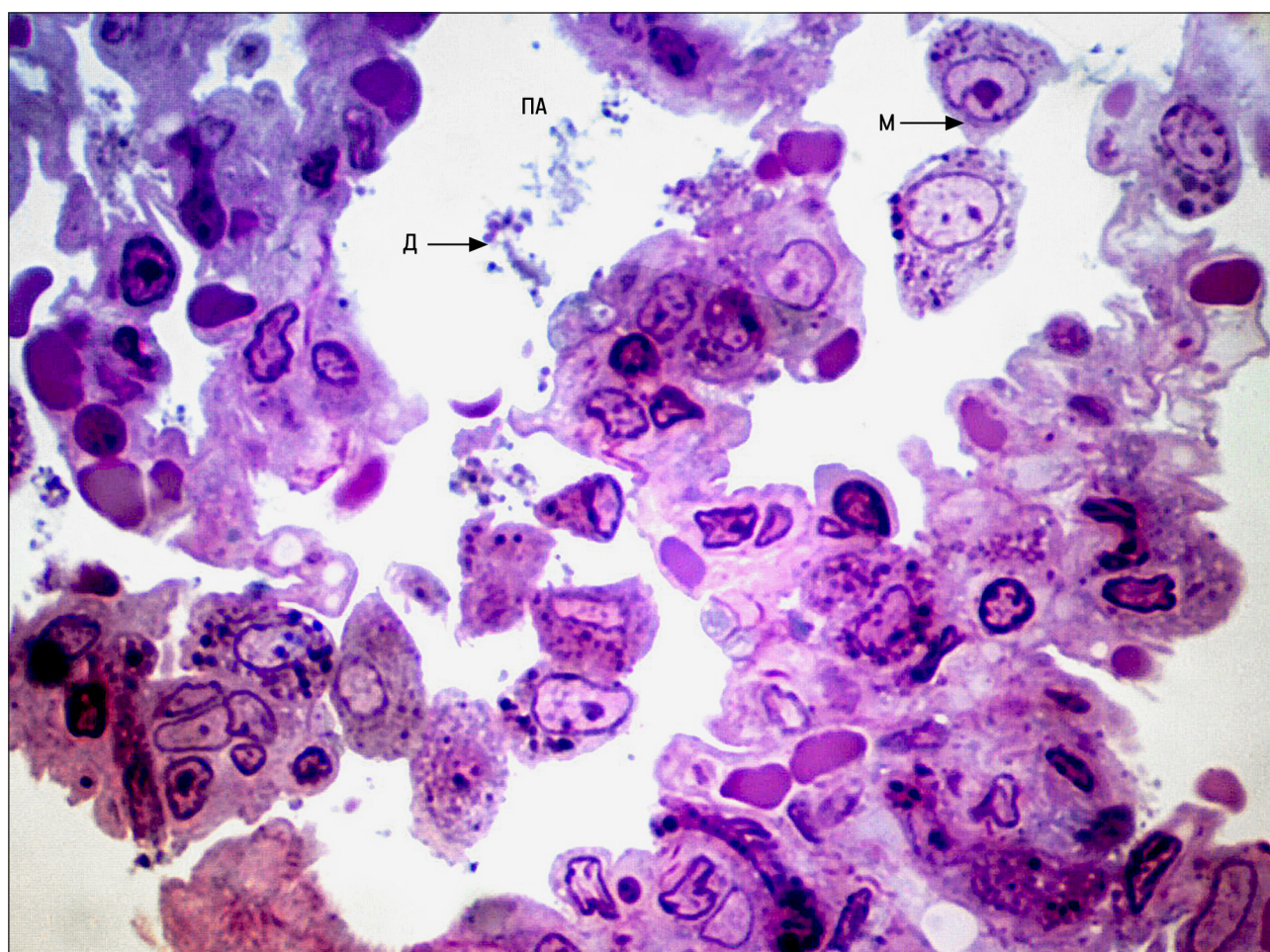


Рис. 2. Нейтрофилы и макрофаги в альвеолах легких у крысы при интратрахеальном введении *E. coli* на фоне эмоционально-болевого стресса.

ПА — просвет альвеолы; М — макрофаг; Д — клеточный детрит и бактерии. Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим и основным фуксином. Об. 100, ок.15

Альвеолоциты часто утрачивали контакты с базальной пластинкой. В межальвеолярных перегородках располагались фрагменты лизированных и гомогенизированных коллагеновых волокон. Среди альвеолоцитов II типа встречались клетки, имеющие набухшие митохондрии с частичной или полной утратой крист. В пластинчатых тельцах количество осmioфильного материала уменьшалось, ламеллы подвергались гомогенизации или лизировались, и на их местах образовывались оптически пустые пространства (рис. 3). Часть альвеолоцитов II типа имели электронно-плотную цитоплазму, уменьшенные в размере гомогенные ядра в состоянии пикноза. Выявлялись альвеолоциты с положительной Ароптаг-реакцией (рис. 4), количество которых превосходило контрольные показатели (см. рис. 1, а).

Иммуноцитохимическое исследование выявило увеличение количества клеток, экспрессирующих ММП-9 среди альвеолоцитов и лейкоцитов (рис. 5). Число альвеолоцитов II типа, экспрессирующих ММП-9, превосходило контрольные показатели (см. рис. 1, б).

Число нейтрофилов с положительной реакцией на ММП-9 в альвеолах было больше, чем у животных контрольной группы через 1 сут, и практически не отличалось на 4-е сутки опыта. Количество ММП-9-позитивных макрофагов по сравнению с таковым в контроле в альвеолах было больше в 1-е сутки наблюдения и уменьшалось к 4-м суткам (см. таблицу).

Эндотелиоциты легочных сосудов во все сроки наблюдения были ММП-9-иммунопозитивными. В сосудах лейкоциты, экспрессирующие ММП-9, контактировали с обнаженной базальной мембраной. Они мигрировали за ее пределы и периваскулярно формировали крупные инфильтраты.

У животных подопытной группы при введении ОТ в респираторных отделах легких при наличии признаков альтерации, отека и лейкоцитарной инфильтрации не наблюдалось деструктивных изменений. Электронно-микроскопическая организация альвеолоцитов II типа свидетельствовала об активизации внутриклеточного метаболизма, проявляющейся гиперплазией мембран гранулярной эндоплазматической сети, увеличением коли-

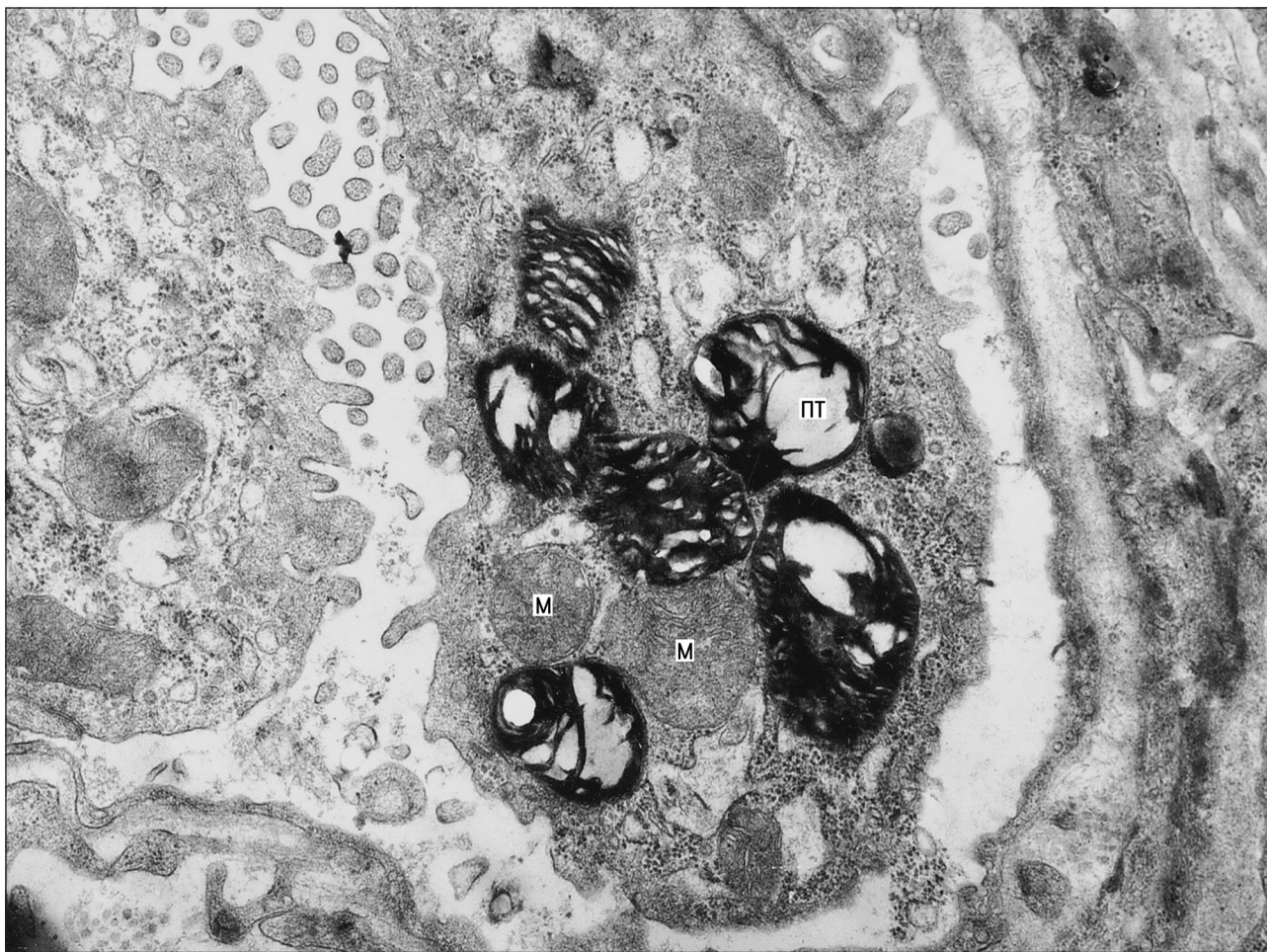


Рис. 3. Альвеолоцит II типа с признаками деструктивных изменений в митохондриях и пластинчатых тельцах легкого крысы при интратрахеальном введении *E. coli* на фоне эмоционально-болевого стресса.

ПТ — пластинчатое тельце; М — митохондрии. Ув. 25 000

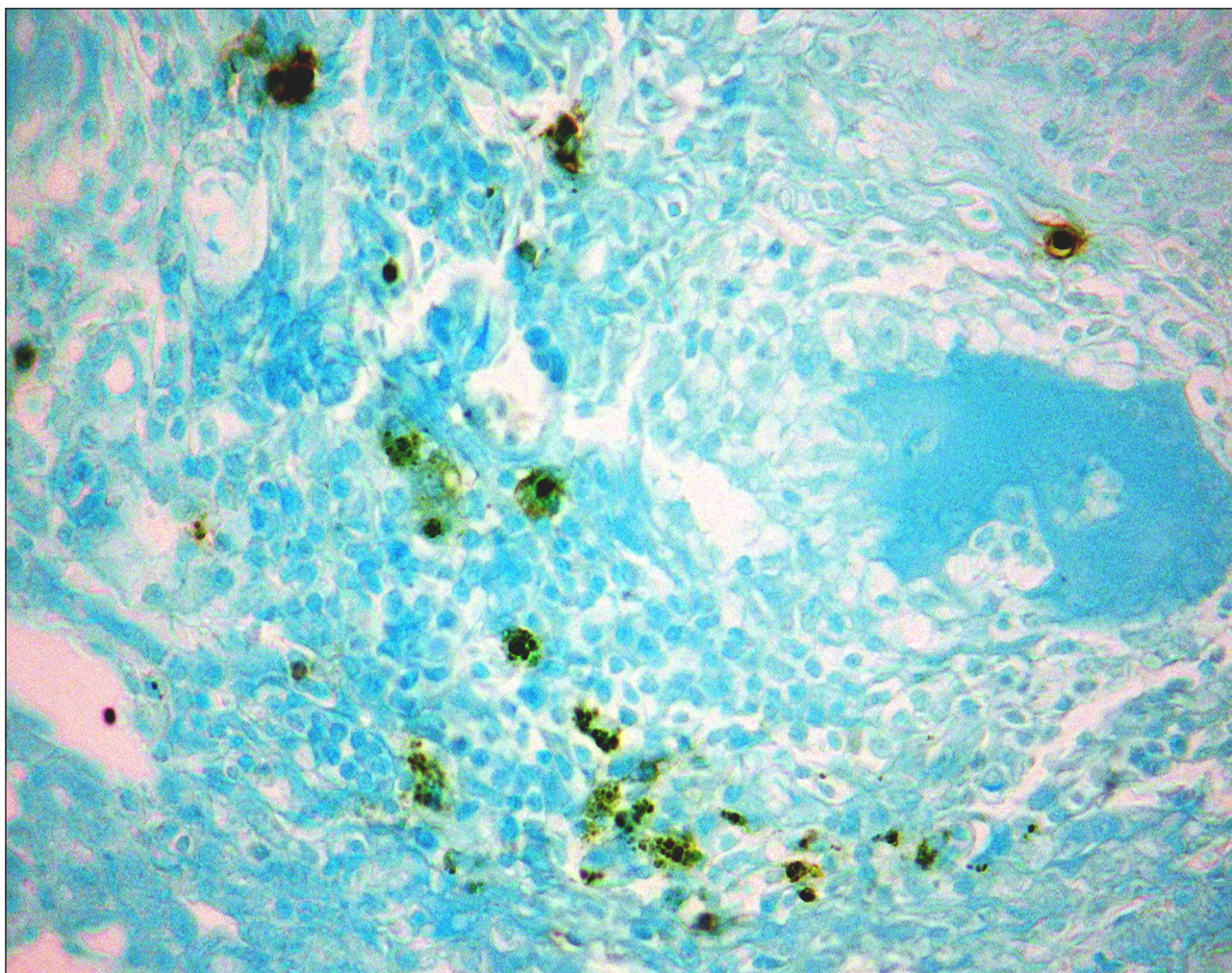


Рис. 4. Клетки с положительной Apoptag-реакцией в легком у крысы при интратрахеальном введении *E. coli* на фоне эмоционально-болевого стресса.

Apoptag-реакция. Об. 40, ок.15

чества, объемной плотности осмиофильных пластинчатых телец и митохондрий.

Количество альвеолоцитов II типа, экспрессирующих ММП-9 (см. рис. 5), было меньше, чем в группах сравнения (см. рис. 1, б). Число погибающих альвеолоцитов, что подтверждалось их электронно-микроскопическими признаками, и количество Apoptag-позитивных клеток уменьшалось по сравнению с таковым в контрольной и 2-й подопытной группой (см. рис. 1, а).

При введении ОТ лейкоцитарная инфильтрация была выражена в меньшей степени, чем у животных, его не получавших. Количество нейтрофилов в альвеолах легких было меньше, чем у контрольных животных и животных, не получавших ОТ. Число макрофагов в альвеолах во все сроки наблюдения было больше, чем в контроле, но меньше у животных, не получавших ОТ (см. табл. 1).

У крыс 3-й подопытной группы в легких количество клеток, экспрессирующих ММП-9, было

незначительным. Экспрессия ММП-9 была характерна для нейтрофилов и макрофагов. Количество нейтрофилов, экспрессирующих ММП-9, по сравнению с таковым во 2-й группе было меньше во все сроки наблюдения, а макрофагов меньше на 4-е сутки по сравнению с контролем (см. таблицу). Мигрирующие нейтрофилы и макрофаги формировали инфильтраты периваскулярно, где содержание ММП-9-позитивных нейтрофилов было меньше, чем во 2-й подопытной группе.

Обсуждение полученных данных. Результаты световой микроскопии выявили у животных 2-й подопытной группы значительную инфильтрацию нейтрофилами и макрофагами респираторных отделов легких. Реакция нейтрофилов и макрофагов является важным признаком синдрома острого повреждения легких при воздействии кишечной палочки и её эндотоксинов [3]. Результаты настоящего исследования показали высокий уровень экспрессии ММП-9

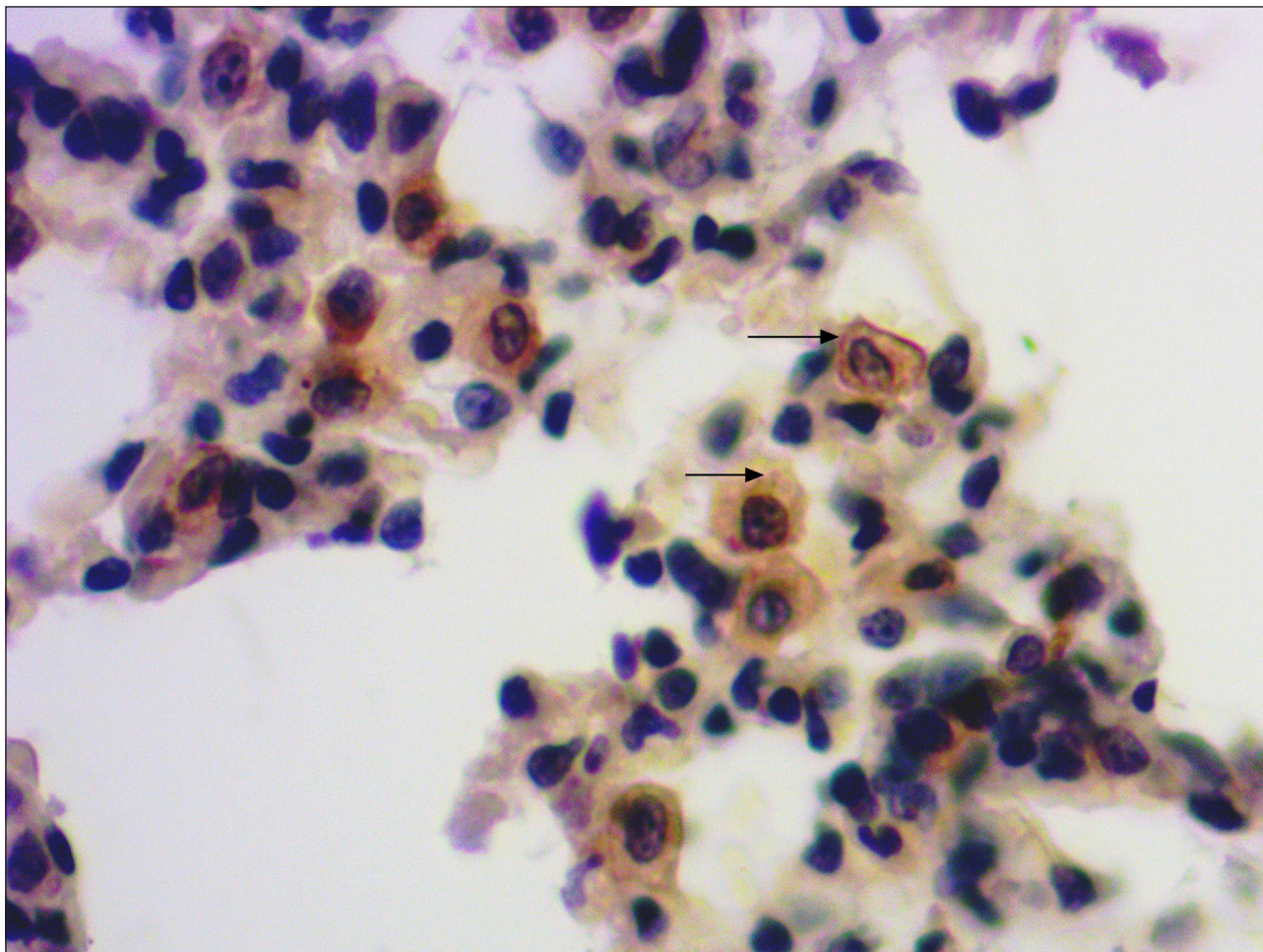


Рис. 5. Респираторный отдел легкого крысы при интратрахеальном введении *E. coli* на фоне эмоционально-болевого стресса. Клетки, экспрессирующие ММП-9 (стрелки). Иммуногистохимическая реакция. Об. 100, ок. 15

в лейкоцитах, резидентных клетках легких и межклеточном веществе. Увеличение количества клеток, экспрессирующих ММП-9, совпало с повышенной степенью лейкоцитарной инфильтрации в легких. Существует предположение, что ММП-9 является основным фактором, обеспечивающим лейкоцитам возможность прохода через базальные мембраны [4].

У животных 2-й подопытной группы деструктивные изменения клеток резидентов и интерстиция легких наблюдались на фоне увеличения количества клеток, экспрессирующих ММП-9, и степень деструктивных изменений находилась в прямой зависимости от увеличения их количества. Вместе с тем ММП-9, обеспечивая миграцию лейкоцитов при инфицировании или повреждении легких, при неконтролируемом увеличении ее количества и активности разрушает клетки-резиденты, межклеточное вещество и таким образом стимулирует воспаление [11].

Полученные результаты об уменьшении инфильтрации легких нейтрофилами и макро-

фагами при введении ОТ согласуются с данными ряда исследований, посвященных изучению действия ОТ в условиях воспаления в органах других систем организма. Применение ОТ при экспериментальном воспалении органов пищеварительного тракта оказывало эффективное противовоспалительное и противоотечное действие, которое сопровождалось уменьшением проницаемости сосудов и миграции лейкоцитов с уменьшением лейкоцитарной инфильтрации в очагах воспаления [2].

Данные иммуногистохимического исследования у крыс 3-й подопытной группы выявили уменьшение экспрессии ММП-9 в лейкоцитах, резидентных клетках и межклеточном веществе, что соответствовало низкому уровню лейкоцитарной инфильтрации и уменьшению признаков альтерации структур респираторных отделов и легочных сосудов. Эти данные позволяют предположить, что миграция активированных лейкоцитов из сосудов снижалась в связи с уменьшением экспрессии ММП-9. Возможно, подавление

ние ОТ миграции лейкоцитов из сосудов связано с его участием в регуляции экспрессии ММП-9. Сведений об участии ОТ в регуляции экспрессии ММП-9 в легких нет. При изучении патологии легких на различных моделях воспаления получены факты о прямой зависимости между увеличением уровня провоспалительных цитокинов и увеличением экспрессии и секреции ММП-9 клетками легких [9]. Известно, что под действием ОТ синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов в макрофагах, нейтрофилах и эндотелиоцитах снижается [10], что является фактором уменьшения экспрессии ММП-9.

Таким образом, полученные данные позволили сделать вывод о патогенетической роли ММП-9 при инфицировании на фоне комбинированного стресса. Деструкция клеток и межклеточного вещества легкого является результатом воздействия ММП-9 на структуры легкого путем разрушения базальных мембран сосудов и альвеол, эпителия легких, деградации коллагеновых волокон, увеличения проницаемости стенки сосудов и активизации миграции лейкоцитов в интерстиций респираторных отделов и стенок сосудов, вызывая задержку восстановления структур легкого.

Применение ОТ уменьшило негативное действие стрессорных факторов на структуры легких, что было связано со снижением лейкоцитарной инфильтрации, уменьшением экспрессии и повреждающего действия ММП-9 и способствовало сохранению и активизации протекторных свойств лейкоцитов и клеток резидентов легких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стадников А.А., Безносик Р.В., Шевлюк Н.Н., Козлова А.Н. Гисто- и цитологические аспекты гипоталамической нейро-эндокринной регуляции взаимодействий про- и эукариот, реализуемых в эпителиальных структурах трахеи и бронхов крыс // Вестн. Уральск. мед. акад. науки. 2011. Т. 1, вып. 2. С. 69–70.
2. Третьяков А.А., Чумаков А.М. Экспериментально-гистологическое изучение влияния окситоцина на репарацию структур печени и общего желчного протока // Морфология. 2010. Т. 137, вып. 4. С. 192.
3. Corbel M., Boichot E., Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury // Braz. J. Med. Biol. Res. 2000. Vol. 33, № 7. P. 749–754.
4. Delclaux C., Delacourt C., D'Ortho M. P. et al. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1996. Vol. 14, № 3. P. 288–295.
5. Desiderato O., Mac Kinnon J.R., Hisson H. Development of gastric ulcer in rats following stress termination // J. Comp. Physiol. Psychol. 1974. Vol. 87, № 2. P. 208–214.
6. Kim J.Y., Choeng H.C., Ahn C., Cho S.H. Early and late changes of MMP-2 and MMP-9 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis // Yonsei Med. J. 2009. Vol. 50, № 1. P. 68–77.
7. Kolaczowska E., Plytycz B., Arnold B. et al. Increased cyclooxygenase activity impairs apoptosis of inflammatory neutrophils in mice lacking gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 // Immunology. 2009. Vol. 128, № 1. P. 262–274.
8. Lukkarinen H., Hogmalm A., Lappalainen U., Bry K. Matrix metalloproteinase-9 deficiency worsens lung injury in a model of bronchopulmonary dysplasia // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2009. Vol. 41, № 1. P. 59–68.
9. Sasaki M., Kashima M., Ito T. et al. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha // Mediators Inflamm. 2000. Vol. 9, № 3–4. P. 155–160.
10. Szeto A., Nation D. A., Mendez A. J. et al. Oxytocin attenuates NADPH-dependent superoxide activity and IL-6 secretion in macrophages and vascular cells // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2008. Vol. 295, № 6. P. 1495–1501.
11. Tetley T.D. Proteinase imbalance: its role in lung disease // Thorax. 1993. Vol. 48, № 5. P. 560–565.

Поступила в редакцию 14.04.2017

Получена после доработки 29.06.2017

THE CHANGES IN THE LUNG STRUCTURE AND MATRIX METALLOPROTEINASE 9 EXPRESSION IN RATS UNDER THE INFLUENCE OF OXYTOCIN IN THE COMBINED STRESS

A.N.Kozlova

Using light, electron microscopy and immunohistochemistry, the changes in lung structure and matrix metalloproteinase 9 (MMP 9) expression were studied in 30 rats exposed to combined stress (intratracheal infusion of *E. coli* in association with emotional painful stress) and oxytocin (OT) injections. Studies have shown that the combined stress resulted in the increased expression of pulmonary MMP-9, accompanied by the activation of neutrophil and macrophage migration with the destruction of cells and intercellular substance in the lung. In animals treated with OT, the expression of MMP 9 was significantly reduced and was associated with lower levels of destructive changes and the infiltration of the lungs by neutrophils and macrophages. The results obtained suggest the pathogenetic role of MMP 9 in combined stress lesions and its involvement in the regulation of MMP 9 expression in the lungs.

Key words: lung, matrix metalloproteinase 9, combined stress, oxytocin

Department of Histology, Cytology, and Embryology, Orenburg State Medical University