

Е.В. Пруткина, А.В. Сепп, Н.Н. Цыбиков

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 В ЛЕГКИХ ПРИ РАЗВИТИИ ДИСТРЕСС-СИНДРОМА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ (Чита)

На нелинейных крысах-самцах воспроизводили острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) путем эндотрахеального введения лизата 45–55 тысяч крысиных нейтрофилов (способ защищен патентом РФ), контрольной группе вводили физиологический раствор. Животных вывели из эксперимента на 1-е, 3-е и 6-е сутки; методом иммуногистохимии определяли экспрессию матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) клетками легких. И в опытной, и в контрольной группах ММП-9 экспрессировали нейтрофилы, макрофаги, фибробласты, эндотелиоциты и альвеолоциты 2-го типа. В контрольной группе экспрессия ММП-9 во всех клетках, кроме альвеолоцитов 2-го типа, была одинаково низкой, динамики не имела. В альвеолоцитах 2-го типа она снижалась на 6-е сутки. В экссудативную стадию ОРДС происходил значительный прирост экспрессии ММП-9 в нейтрофилах, макрофагах, фибробластах, эндотелии и альвеолоцитах 2-го типа. В пролиферативную стадию экспрессия ММП-9 оставалась высокой в большинстве клеток, снижаясь только в альвеолоцитах 2-го типа. В фибротическую стадию экспрессия ММП-9 возвращалась к уровню контрольной группы в макрофагах, альвеолоцитах 2-го типа, эндотелии; в нейтрофилах и фибробластах она сохранялась по-прежнему высокой.

Ключевые слова: экспериментальный дистресс-синдром, матриксная металлопротеиназа-9, клетки легких

PECULIARITIES OF SYNTHESIS OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 IN THE LUNGS DURING EXPERIMENTAL DEVELOPMENT OF DISTRESS SYNDROME

E.V. Prutkina, A.V. Sepp, N.N. Tsybikov

Chita State Medical Academy, Chita

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) was reproduced in nonlinear male rats by intratracheal instillation of 45–55 thousand lysate rat neutrophils (method patented in RF); the control group was injected with saline solution. The animals were taken from the experiment at 1, 3 and 6 days, the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by cells of the lungs was determined by immunohistochemistry at each day. The expression of MMP-9 was found in neutrophils, macrophages, fibroblasts, endothelium and type 2 alveolocytes in the both groups. In the control group the expression of MMP-9 was found equally low in the all cells, except type 2 alveolocytes. It was decreased in type 2 alveolocytes on day 6. A significant increase in the expression of MMP-9 was found in neutrophils, macrophages, fibroblasts, endothelium and type 2 alveolocytes in the exudative stage of ARDS. In the proliferative stage the expression of MMP-9 was high in all the cells, decreasing only in type 2 alveolocytes. In the fibrotic stage of expression of MMP-9 returned to the level of the control group in macrophages, type 2 alveolocytes, the endothelium; in neutrophils and fibroblasts it remained high.

Key words: experimental distress syndrome, matrix metalloproteinase-9, cells of the lungs

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) является основным осложнением жизнеугрожающих состояний. С 90-х гг. XX века выделяют его раннюю обратимую стадию — острое повреждение легких (ОПЛ). Летальность при ОРДС составляет более 80 %, но в случае купирования процесса на стадии ОПЛ она минимальна. В связи с большим количеством и гетерогенностью причин механизмы перехода обратимого ОПЛ в последующие фазы процесса исследованы недостаточно, что делает фундаментальные изыскания в этом направлении особенно актуальными [3].

Обязательным звеном патогенеза ОПЛ/ОРДС является повреждение альвеолярно-капиллярной мембраны с развитием некардиогенного отека легких. Учитывая, что в состав аэрогематического барьера входят компоненты соединительной ткани, возникло предположение об участии матриксных металлопротеиназ (ММП) в патогенезе синдрома [3]. ММП — семейство протеолитических ферментов, расщепляющих основные компоненты внеклеточного матрикса. Они играют важную

роль как в физиологических процессах (рост плаценты, эмбриогенез, репарация тканей), так и при патологии (опухолевая инвазия, фиброз легких, атеросклероз и др.) [1, 4, 6, 8]. Роль ММП в развитии ОПЛ/ОРДС изучалась путем определения концентрации ферментов в крови и/или бронхоальвеолярной лаважной жидкости [3], что не всегда отражает истинную картину локального процесса.

Целью настоящей работы стало исследование экспрессии ММП-9 различными клетками в легких в зависимости от стадии развития экспериментального ОПЛ/ОРДС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

ОПЛ/ОРДС воспроизводили по оригинальной методике на половозрелых нелинейных крысах-самцах. Под местной анестезией 0,25% раствором новокаина проводили тонкоигольную пункцию трахеи с одновременным введением лизата 45–55 тысяч крысиных нейтрофилов в 0,15–0,20 мл физиологического раствора [5]. Контрольной группе инъецировали эквивалентный объем стерильного

физиологического раствора. Животных выводили из эксперимента путем передозировки кетамина на 1-е (по $n = 25$ в опыте и контроле), 3-и ($n = 24$) и 6-е (по $n = 21$) сутки. Развитие ОПЛ/ОРДС во всех случаях подтверждали морфологически.

Отобранный аутопсийный материал фиксировали в 10% забуференном растворе формалина (рН 7,1–7,2) в течение 12 часов, после чего проводили заливку фрагментов в парафин. Иммуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах легочной паренхимы биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом. Срезы толщиной 3–4 мкм депарафинизировали и регидратировали по стандартной схеме. Для демаскировки антигенов проводили двукратную обработку срезов в микроволновом режиме при мощности 650 Вт в течение 15 мин с интервалом 5 мин между процедурами для охлаждения в цитратном буфере с рН 6,0 («Дако», Дания). В качестве первичных использовали видоспецифичные козы антитела к ММР-9 («Santa Cruz biotechnology», США). В качестве вторичных применяли биотинилированные анти-козы антитела в составе рекомендованной производителем системы визуализации ABS Staining System («Santa Cruz biotechnology», США) с 3,3-диаминобензидина тетрахлоридом в качестве хромогена. Дополнительную докраску срезов проводили водным раствором гематоксилина Гаррисона. Использовали рекомендованные производителем контрольные срезы: без первичных антител (для исключения неспецифического окрашивания) и фрагменты тканей плаценты (в качестве положительного контроля).

Величину экспрессии ММР-9 в срезе определяли для всех продуцирующих клеток раздельно: при 400-кратном увеличении производился подсчет не менее 100 целевых клеточных элементов в 10 случайно выбранных полях зрения. В каждом поле количественную оценку экспрессии антигена проводили в баллах по следующей шкале: отрицательный уровень — если позитивных клеток было менее 10 % в поле зрения; 1 балл — при наличии 10–25 % клеток; 2 балла — 25–50 % клеток; 3 балла — 50–75 % клеток; 4 балла — в случае окрашивания более 75 % клеток [7].

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ BIOSTAT 3.03. При сравнении групп использовали критерий χ^2 , различия считали значимыми при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде процента полей зрения с соответствующим уровнем экспрессии антигена по отношению к исследованному числу полей в срезе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

При развитии экспериментального ОПЛ/ОРДС, так же, как и в контрольной группе, ММР-9 в разной степени экспрессировали нейтрофилы, макрофаги, фибробласты, эндотелиоциты и альвеолоциты 2-го типа.

При морфологическом исследовании легких животных контрольной группы, вне зависимости

от временных промежутков эксперимента, в единичных случаях отмечались признаки острого нарушения микроциркуляторного кровотока (полнокровие, агрегаты форменных элементов крови). Зафиксированные спорадические отклонения мы связываем с особенностями танатогенеза подопытных животных. При введении физиологического раствора экспрессия ММР-9 нейтрофилами, макрофагами, эндотелиоцитами и фибробластами была одинаковой: 1–2 балла в 8–22 % полей зрения ($p > 0,05$), оставаясь неизменной во всех временных точках эксперимента ($p > 0,05$). Исключение составили альвеолоциты 2-го типа: в 1-е и 3-и сутки эксперимента экспрессия ими металлопротеиназы была одинаковой и не отличалась от остальных клеток ($p > 0,05$), но к 6-м суткам она снижалась до 1 балла в 5 % полей зрения ($p = 0,04$).

В опытной группе через 24 ч определялась острая (экссудативная) стадия развития синдрома — морфологический эквивалент непосредственно ОПЛ [2, 3], которая характеризовалась проявлениями «острого неинфекционного диффузного альвеолита» с накоплением в просвете альвеол нейтрофилов, мононуклеарных клеток, десквамированного эпителия, отечной жидкости, эритроцитов. В просвете сосудов отмечались множественные агрегаты полиморфноядерных лейкоцитов. На этом фоне наибольшая экспрессия ММР-9 была зафиксирована в нейтрофильных гранулоцитах; фибробласты, макрофаги, эндотелии и альвеолоциты 2-го типа синтезировали металлопротеиназу в одинаковой степени (табл. 1). При этом уровень экспрессии ММР-9 в указанных клетках был много выше, чем в контроле (при всех сопоставлениях $p = 0,000$).

На 3-и сутки эксперимента в легких животных опытной группы отмечались: разрешение от отека, формирование множественных мелкоочаговых ателектазов, миграция мононуклеарных лейкоцитов, признаки пролиферации фибробластов и синтеза коллагена, что является характерным для пролиферативной фазы ОРДС [2, 3]. В эту стадию, по сравнению с предыдущей, экспрессия ММР-9 нейтрофилами оставалась по-прежнему высокой ($p = 0,06$), хотя имела тенденцию к уменьшению. В равной степени с полиморфноядерными лейкоцитами фермент экспрессировали эндотелиоциты и фибробласты — синтез металлопротеиназы в них также оставался на уровне 1-й фазы ОПЛ/ОРДС ($p = 0,25$ и $p = 0,19$ соответственно). Макрофаги и альвеолоциты 2-го типа экспрессировали ММР-9 с одинаковой активностью, но в меньшей степени, чем вышеописанные клетки (табл. 2). При сопоставлении интенсивности синтеза фермента в них с уровнем предыдущей фазы синдрома оказалось, что в макрофагах он не изменился ($p = 0,16$), а в альвеолоцитах 2-го типа — уменьшился ($p = 0,049$).

При сопоставлении уровня экспрессии ММР-9 во 2-ю фазу ОПЛ/ОРДС с контролем оказалось, что клетки животных опытной группы синтезировали фермент намного активнее (при всех сравнениях

Таблица 1

Уровень экспрессии MMP-9 в 1-ю (экссудативную) фазу ОПЛ/ОРДС (n = 25; 250 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1–2 балла (% полей зрения)	3–4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
Нейтрофилы	20	28	52	–
Макрофаги	54	36	10	$p = 0,000^*$
Эндотелий	36	46	18	$p = 0,002^*$ $p_1 = 0,17$
Фибробласты	48	40	12	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,83$ $p_2 = 0,43$
Альвеолоциты 2-го типа	40	42	18	$p = 0,002^*$ $p_1 = 0,29$ $p_2 = 0,91$ $p_3 = 0,61$

Примечание: p – значение различий в сравнении с нейтрофилами; p_1 – значение различий в сравнении с макрофагами; p_2 – значение различий в сравнении с эндотелием; p_3 – значение различий в сравнении с фибробластами; * – значимые различия.

Таблица 2

Уровень экспрессии MMP-9 во 2-ю (пролиферативную) фазу ОПЛ/ОРДС (n = 24; 245 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1–2 балла (% полей зрения)	3–4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
Нейтрофилы	36	34	30	–
Макрофаги	62	20	18	$p = 0,034^*$
Эндотелий	52	32	16	$p = 0,16$ $p_1 = 0,39$
Фибробласты	32	46	22	$p = 0,44$ $p_1 = 0,006^*$ $p_2 = 0,13$
Альвеолоциты 2-го типа	62	32	6	$p = 0,003^*$ $p_1 = 0,11$ $p_2 = 0,26$ $p_3 = 0,005^*$

Примечание: см. таблицу 1.

Таблица 3

Уровень экспрессии MMP-2 в 3-ю (фибротическую) фазу ОПЛ/ОРДС (n = 21; 210 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1–2 балла (% полей зрения)	3–4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
Нейтрофилы	44	56	0	–
Макрофаги	78	22	0	$p = 0,001^*$
Эндотелий	60	40	0	$p = 0,16$ $p_1 = 0,08$
Фибробласты	58	42	0	$p = 0,16$ $p_1 = 0,08$ $p_2 = 0,1$
Альвеолоциты 2-го типа	82	18	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,80$ $p_2 = 0,03^*$ $p_3 = 0,02^*$

Примечание: см. таблицу 1.

$p < 0,05$). Исключение составили альвеолоциты 2-го типа: в пролиферативную фазу синдрома экспрессия ими MMP-9 была такой же, как и при введении физиологического раствора ($p = 0,09$).

Через 6 суток после введения лизата фиксировались морфологические маркеры фибротической фазы ОПЛ/ОРДС [2, 3]: увеличение объема соединительной ткани в интерстиции легких, утолщение стенок альвеол, в том числе и за счет резпитализации и пролиферации альвеолоцитов. Кроме того, определялись изменения в интиме артериол в виде гипертрофии мышечного слоя, в единичных случаях – вплоть до их полной облитерации. На этом

фоне наибольшая экспрессия MMP-9 отмечалась в нейтрофилах, наименьшая – в альвеолоцитах 2-го типа (табл. 3).

При сравнении уровня экспрессии MMP-9 в фибротическую фазу ОРДС с контролем зафиксированы следующие особенности. Синтез фермента в нейтрофилах и фибробластах, несмотря на снижение к 3-й стадии синдрома, оставался намного более высоким, чем в контроле ($p = 0,000$ в обоих случаях). В макрофагах, эндотелии и альвеолоцитах 2-го типа экспрессия металлопротеиназы уменьшалась до уровня контроля ($p = 0,16$, $p = 0,08$ и $p = 0,12$ соответственно).

Известно, что ММР-9, как и другие матриксные металлопротеиназы, обладает относительной субстратной специфичностью: способна расщеплять не только денатурированный коллаген (желатину), но и нативные коллагены VI (входит в состав базальных мембран), V и XI типов, эластин, IL-8 и IL-1 β , субстанцию P, альфа-антитрипсин, плазминоген и др. [4]. Данные, полученные нами в контрольной группе, свидетельствуют о том, что ММР-9 в легких экспрессируется многими клетками. В ответ на минимальное воздействие (эндотрахеальное введение физиологического раствора) только альвеолоциты 2-го типа отвечают повышением синтеза фермента, которое сохраняется на протяжении трех суток. Повреждения в итоге не наступало, следовательно, такие колебания не нарушают равновесия в системе металлопротеиназ. А альвеолоциты 2-го типа, по всей видимости, являются клетками, наиболее чутко реагирующими на воздействие повреждающих факторов повышением протеолитической активности.

Резкое увеличение экспрессии ММР-9 в экссудативную фазу (собственно ОПЛ) клетками легких, безусловно, вносит свой вклад в развитие «протеазного взрыва» в локусе воспаления. В пролиферативную стадию ОРДС синтез ММР-9 остается по-прежнему высоким, играя, вероятно, двойную роль. Исследуемая металлопротеиназа активирует трансформирующий фактор роста β (TGF β) и параллельно разрушает важнейшие провоспалительные цитокины IL-1 β и IL-8 [4, 8]. Следовательно, в эту стадию синдрома ММР-9 препятствует адгезии нейтрофилов к эндотелию и их гиперактивации (нивелируются свойства IL-1 β , разрушается фибронектин), а также опосредованно участвует в привлечении в очаг моноцитов крови (TGF- β является их хемоаттрактантом), что направлено на ограничение альтерации. С другой стороны, с участием ММР-9 происходит активация фибринолиза (вклад в развитие ДВС-синдрома), разрушение эластина стенок альвеол. Учитывая, что во 2-ю стадию ОРДС повреждение азрогематического барьера становится потенциально необратимым, альтеративные процессы с участием ММР-9 доминируют. В 3-ю фазу развития ОРДС экспрессия металлопротеиназы в нейтрофилах и фибробластах остается в 2 раза выше, чем в контроле, что, безусловно, является одним из молеку-

лярных механизмов участия этих клеток в развитии фибротических изменений легочной ткани.

Таким образом, в каждую стадию развития ОПЛ/ОРДС синтез ММР-9 имеет свои особенности, внося вклад как в повреждение альвеолярно-капиллярной мембраны, так и в развитие фиброза в исходе процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коган Е.А., Тьюнг Ф.В., Демур С.А. Механизм ремоделирования легочной ткани при прогрессировании идиопатического легочного фиброза // Архив патологии. — 2010. — № 4. — С. 30–36.
2. Мороз В.В., Голубев А.М., Марченков Ю.В., Городовикова Ю.А. и др. Морфологические признаки острого повреждения легких различной этиологии (экспериментальное исследование) // Общая реаниматология. — 2010. — Т. VI, № 3. — С. 29–34.
3. Острый респираторный дистресс-синдром: практическое руководство / под ред. Б.Р. Гельфанда, В.Л. Кассиля — М.: Литтера, 2007. — 232 с.
4. Потеряева О.Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) // Медицина и образование в Сибири. — 2010. — № 5. — С. 7–17.
5. Способ моделирования острого повреждения легких: пат. 2456677 Рос. Федерация: МПК G09B23/28 / Цыбиков Н.Н., Пруткина Е.В., Сепп А.В., Исакова Н.В.; патентообладатель ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ. — Опубл. 20.07.2012, Бюл. 20. — 11 с.
6. Шойхет Я.Н., Кореновский Ю.В., Мотин Ю.Г., Лепилов А.В. и др. Роль матриксных металлопротеиназ при воспалительных заболеваниях легких // Проблемы клинической медицины. — 2008. — № 3 (15). — С. 99-101.
7. Aoki M., Nabeshima K., Koga K., Hamasaki M. et al. Imatinib mesylate inhibits cell invasion of malignant peripheral nerve sheath tumor induced by platelet-derived growth factor-BB // Laboratory Investigation. — 2007. — Vol. 87. — P. 767–779.
8. Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry // Circulation Res. — 2003. — N 2. — P. 827–839.

Сведения об авторах

Пруткина Елена Владимировна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ (672090, г. Чита, ул. Горького 39-А; тел.: 8 (3022) 32-18-59; e-mail: lenap75@mail.ru)

Сепп Андрей Валентинович – ассистент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ (672090, г. Чита, ул. Горького 39-А; тел.: 8 (3022) 35-37-96; e-mail: andrey82708@gmail.com).

Цыбиков Намжил Нанзатович – доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ (672090, г. Чита, ул. Горького 39-А; тел.: 8 (3022) 32-18-59; e-mail: thybikov@mail.ru).