

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2021-25(2)-02

УДК: 611.018:616.24:577.112.3:599.323.45

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗМІН ТКАНИНИ ЛЕГЕНЬ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ

Самборська І. А.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: samborska1990@gmail.com

Статтю отримано 18 березня 2021 р.; прийнято до друку 23 квітня 2021 р.

Анотація. Ураження органів дихальної системи є частим явищем в умовах сьогодення. Підвищений рівень гомоцистеїну (Гц) є одним із предикторів бронхо-легеневої патології. Протягом останніх років встановлений взаємозв'язок між концентрацією його в плазмі крові та ризиком розвитку ХОЗЛ, бронхіальної астми, раку легень. Патогенез пошкодження дихальної системи за умов гіпергомоцистеїнемії (ГГц) досі вивчається, однак відомо, що він є причиною ендотеліальної дисфункції, окисного стресу, стресу ендоплазматичної сітки, які лежать в основі ураження легеневої тканини. Метою дослідження є встановлення порівняльної характеристики гістологічних змін тканини легень щурів різного віку за умов ГГц. Експериментальне дослідження проведене на 64 білих нелінійних щурах-самцях. У ході експерименту тварин поділено на дві групи - контрольну і дослідну, кожна з яких розподілена на підгрупи залежно від віку - молоді (1-2 місяці), зрілі (6-8 місяців), старі (24-26 місяців). Моделювання стану стійкої ГГц досягали шляхом введення щурам дослідної групи тіолактону Гц у дозі 200 мг/кг маси тіла інтрагастрально протягом 60 днів. Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа SEO SCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera з системою виводу зображення з гістологічних препаратів. Проведені гістологічні дослідження легень тварин молодого віку за умов ГГц встановили помірні деструктивні зміни судин, бронхів, компонентів респіраторного відділу, що мали компенсаторно-приспосувальний та зворотний характер. У щурів зрілого віку при експериментальній ГГц виявили пристосувально-компенсаторні та деструктивні зміни органу. У тварин старшого віку розвиваються найбільш значні деструктивно-дегенеративні зміни порівняно із дослідженнями легень груп молодих та зрілих щурів. Визначальною особливістю для даної вікової групи була надмірна активація фібробластів та розвиток периваскулярного, перибронхіального, інтерстиційного склерозу.

Ключові слова: гіпергомоцистеїнемія, ремоделювання судин, ендотеліальна дисфункція, емфізема, ателектаз, фібробласти, склероз.

Вступ

Ураження органів дихальної системи є частим явищем в умовах сьогодення. Функціональні особливості будови легень, посилений транспорт крові та газів, визначають високий ступінь інтенсивності пошкодження органу при дії різних екзо- і ендогенних факторів. Механізми потрапляння агентів хімічного походження можуть бути інгаляційними та неінгаляційними. Найбільш розповсюдженим є перший тип, що характеризується гострим ураженням легень внаслідок впливу газів, летючих органічних сполук, тощо. При цьому характерним є дифузне альвеолярне пошкодження чи набряк легень. Неінгаляційні шляхи надходження є не менш актуальними, оскільки різноманітні токсини, метаболіти, що транспортуються до тканини легень з током крові протягом тривалого часу, можуть стати причиною виражених морфологічних перебудов органу. Важливим є те, що за даних умов клінічні прояви є незначно вираженими на початкових етапах, а виявляються з часом у вигляді деструктивних змін, емфіземи, ателектазів або склерозу [9, 14, 21].

Одним із предикторів захворювання органів дихальної системи в наш час є амінокислота Гц. За останні роки науковцями встановлені взаємозв'язки між концентрацією його в плазмі крові та ризиком розвитку ХОЗЛ, бронхіальної астми, раку легень. Патогенез пошкоджен-

ня дихальної системи за умов ГГц досі вивчається, однак встановлено, що одним із наслідків його впливу є ураження судинної сітки легеневої паренхіми внаслідок активації синтезу реактивних форм кисню і розвитку окисного стресу, який чинить токсичну дію на ендотеліальні клітини стінок судин. Не виключенням є факт прямого пошкодження легеневої паренхіми при ГГц. За даними літератури, Гц у легенях пригнічує біологічні ефекти оксиду азоту, підвищує активність матриксних металопротеїназ, зумовлює розвиток дисфункції мітохондрій та стресу ендоплазматичної сітки [3, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 16, 22].

Важливим напрямком сучасних гістологічних досліджень є вивчення особливостей змін структури органів при впливі чинників різного походження з урахуванням вікових аспектів. Наразі в літературних джерелах повністю відсутні дані щодо мікроскопічних змін легеневої тканини при ГГц залежно від віку. Тому встановлення порівняльної характеристики впливу підвищеного рівня Гц на структуру органу в тварин різних вікових груп є актуальним завданням.

Матеріали та методи

Досліди проведені на 64 білих нелінійних щурах-самцях. У ході експерименту тварин поділено на дві групи -

контрольну та дослідну, кожна з яких розподілена на підгрупи залежно від віку - молоді (1-2 місяці), зрілі (6-8 місяців), старі (24-26 місяців). Моделювання стану стійкої ГГц досягали шляхом введення щурам дослідної групи тіолактону ГЦ у дозі 200 мг/кг маси тіла інтрагастрально протягом 60 днів [19]. Тварин знеживлювали шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом [4, 15]. Для мікроскопічного дослідження забирали шматочки легень у попередньо зважених тварин усіх груп. Шматочки фіксували в 10 % розчині формаліну, при цьому тривалість експозиції не перевищувала 1-2 доби. Застосований фіксуючий розчин запобігає процесу аутолізу та стабілізує клітини та тканини для їх подальшої обробки та використання в процедурах забарвлення. Далі проводили дегідратацію шматочків у спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафінові блоки. Виготовлені зрізи, товщиною 4-5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином та метиленовим-синім [1, 8]. Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа SEO SCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera з системою виводу зображення з гістологічних препаратів.

Результати

Проведені гістологічні дослідження легень експериментальних тварин молодого віку за умов ГГц встановили порушення легеневої гемодинаміки, набрякові явища структурних компонентів респіраторного відділу, стінок судин та бронхів.

Для великих, середніх, а особливо малих бронхів та бронхіол, характерний набряк та потовщення стінки, її деформація. Деструкція фіброзно-хрящової оболонки та м'язової пластинки призводили до зменшення складок слизової. В просвітах бронхів виявляли серозно-слизовий вміст із десквамованими епітеліоцитами (рис. 1).

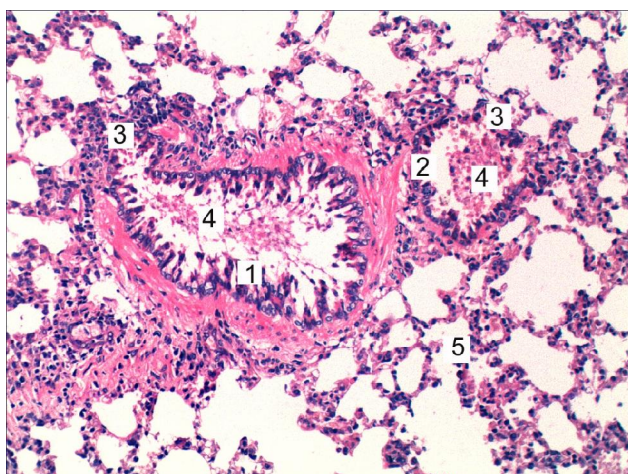


Рис. 1. Мікроскопічні зміни легень тварини молодого віку за умов гомоцистеїнемії. Бронх великого (1) та середнього діаметру (2), деформація стінки (3), серозно-слизовий вміст у просвіті (4), респіраторний відділ (5). Забарвлення гематоксиліном і еозином. x 100.

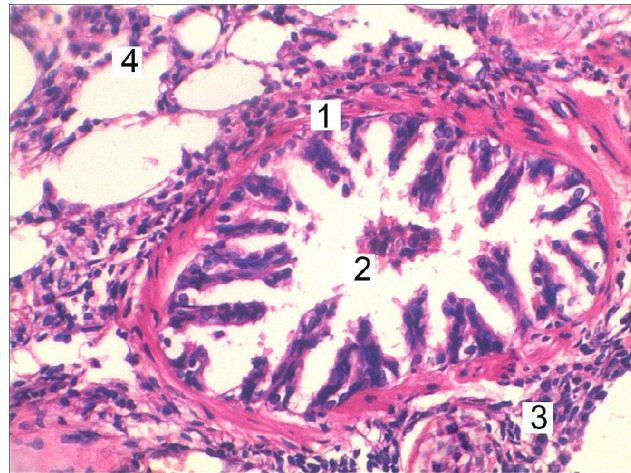


Рис. 2. Мікроскопічні зміни легень тварини зрілого віку за умов гіпергомоцистеїнемії. Деструкція стінки бронха середнього діаметру (1), десквамовані респіраторні епітеліоцити у просвіті (2), інфільтрована лейкоцитами адвентиція (3), респіраторний відділ (4). Забарвлення гематоксиліном і еозином. x 200.

Реорганізація судинної стінки великого та середнього діаметрів проявлялася розширенням просвітів та кровонаповненням, набряком та лейкоцитарною інфільтрацією.

Характерним для даної вікової групи тварин було наявність потоншення міжальвеолярних перетинок, розширення просвіту альвеол і руйнування компонентів аерогематичного бар'єру.

У щурів зрілого віку за умов змодельованої ГГц виявили дисциркуляторні розлади, ремоделювання стінки бронхів із формуванням у їх стінці запальних інфільтратів.

Вивчення реорганізації бронхів показали, що більшість їх просвітів звужені, спазмовані, часто заповнені серозно-слизовим вмістом із десквамованим респіраторним епітелієм. Виявляється набряк, дезорганізація волокон і основної речовини стінки, інфільтрація макрофагами, лімфоцитами, нейтрофілами (рис. 2).

У тварин старшого віку на тлі ГГц встановили значні запальні, деструктивні та характерні склеротичні зміни судин, бронхів, респіраторного відділу. Зміни в бронхах характеризувалися ремоделюванням усіх оболонок стінки. Виразних альтеративних змін зазнає слизова оболонка, в епітеліальній пластинці клітини мали нечіткі мембрани плазмолем, дистрофічно змінену, просвітлену цитоплазму, гіперхромні, пікнотичні ядра. Визначалася десквамація епітеліоцитів в просвіті бронхів. Бронхи були деформовані, як за рахунок атрофії, або гіпертрофії м'язової пластинки, особливо дрібних бронхів та бронхіол, так і за рахунок запальних і склеротичних змін.

При імпрегнації солями срібла виявляється збільшення вмісту волокнистих компонентів в стінці бронхів, особливо адвентиційної оболонки, які володіють інтенсивною аргірофілією, що призводить до перибронхіального склерозу (рис. 3).

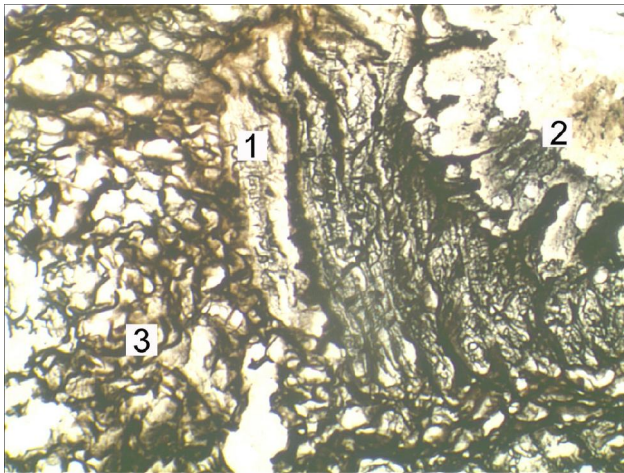


Рис. 3. Мікроскопічний стан легень щура старого віку при імпрегнації нітратом срібла за умов гіпергомоцистеїнемії. Дезорганізація ретикулярних волокон стінки бронха (1), просвіт із слизовим вмістом (2), аргірофільні колагенові волокна адвентиції (3). Метод Гордона-Світса. x 200.

Судини гемомікроциркуляторного русла також були значно змінені, проявлялися гетерогенністю. Для венул характерні були застійні явища, стази, сладжі еритроцитів, тромбоутворення. Ендотеліоцити дистрофічно змінені, містять пікнотичні ядра, що виступають в просвіт судини. Артеріоли мали потовщену, деструктивно змінену стінку та звужений, спазмований просвіт.

Реорганізація судин та бронхів супроводжується змінами паренхіми органу. Тканина легень неоднорідна, переважають зони дис- та ателектазів, в яких виявляється розростання колагенових волокон. Переважно в субплевральних ділянках наявні емфізематозно розширені альвеоли.

Обговорення

Вивчення особливостей патогенетичної дії ГГц на структуру та функції органів дихальної системи є однією з пріоритетних завдань науковців. Чисельні експериментальні дослідження, на сьогоднішній день, встановили лише окремі механізми впливу підвищеного рівня амінокислоти Гц на ті чи інші компоненти бронхо-легеневої системи. Зокрема доведеним є той факт, що важка ГГц є причиною розвитку окисного стресу в тканині легень. Гц накопичується в мітохондріях органу та чинить прямий токсичний вплив на паренхіму. Встановлено також, що за даних умов зростає ступінь карбонілування білків мітохондрій, знижується резервно-адаптаційний потенціал та підвищується активність супероксиддисмутази - одного з основних ферментів антиоксидантного захисту. ГГц призводить до зниження концентрації оксиду азоту внаслідок утворення активних форм кисню, які сприяють прискореній його інактивації та зменшення біодоступності в стінці судин легень [17, 18].

Нещодавні дослідження демонструють, що підвищений рівень Гц є одним з важливих предикторів ХОЗЛ. Як

відомо, основною причиною ХОЗЛ є тривале тютюнопаління. Встановлено, що даний фактор ризику асоціюють також зі значним порушенням метаболізму фолієвої кислоти. Остання є незамінним елементом в реакціях синтезу нуклеїнових кислот, регуляції експресії генів, обміну амінокислоти Гц. Саме фолієва кислота виступає в ролі кофактора для ензимів процесу реметилування Гц, що забезпечує його елімінацію з організму. Дефіцит вітаміну В9 стає причиною надмірного накопичення Гц в плазмі крові та всередині клітин. Внаслідок активації процесів окиснення макромолекул, в першу чергу ліпідів, білків, ураження стінок судин шляхом прямої токсичної дії Гц на ендотеліоцити судин серця, головного мозку, у пацієнтів з ХОЗЛ зростає ризик коронарної хвороби серця та ішемічних інсультів [2].

Дані наукових джерел демонструють, що порушення фолатного обміну внаслідок дефіциту чи зниження активності ферменту метилентетрагідрофолатредуктази призводять до зменшення в організмі рівнів незамінної амінокислоти метіоніну з одночасним зростанням Гц. Останній, накопичуючись в значній кількості, стає причиною розвитку гіперреактивності дихальних шляхів, зміни клітинного складу легеневої паренхіми, еозинофілії та зростання концентрації цитокінів - IL-4,5 [6].

Наявні окремі дослідження, які свідчать на користь того факту, що зростання концентрації фолатів (> 17,5 нмоль/л) та Гц в плазмі крові в пацієнтів з тривалим терміном паління є ризиком розвитку раку легень. Не дивлячись на те, що вітамін В9 бере участь в утилізації Гц, знижує ризик тромботичних подій, він також стає причиною малігнізації, що пояснюють стимулюванням синтезу ДНК і злочасної трансформації клітин [20].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Проведені гістологічні дослідження легень тварин молодого віку за умов ГГц встановили помірні деструктивні зміни судин, бронхів, компонентів респіраторного відділу, що мали компенсаторно-приспосувальний і зворотний характер.

2. У щурів зрілого віку при експериментальній ГГц виявили пристосувально-компенсаторні та деструктивні зміни органу, а саме - ремоделювання стінок судин, формування в респіраторному відділі дис- та ателектазів, емфіземи, запальних конгломератів.

3. У тварин старого віку розвиваються найбільш значні деструктивно-дегенеративні зміни порівняно із дослідженнями легень груп молодих та зрілих щурів. Встановлено значне ремоделювання судинного русла, бронхів, прояви запального характеру, збільшення ділянок дис- та ателектазів і емфізематозно змінених альвеол респіраторного відділу легень, виявляється порушення альвеолярних стінок. Визначальною особливістю для даної вікової групи була надмірна активація фібробластів та розвиток периваскулярного, перибронхіального, інтерстиційного склерозу.

Список посилань - References

- [1] Bagriy, M. M., Dibrova, V. A., Popadynets, O. G., & Grishchuk, M. I. (Ed.). (2016). *Методики морфологічних досліджень [Methods of morphological research]*. Вінниця: Нова Книга - Vinnytsia: New Book.
- [2] Chaudhary, D., Sharma, N., & Senapati, S. (2019). Serum homocysteine could be used as a predictive marker for chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Front Public Health*, 7, 69. doi: 10.3389/fpubh.2019.00069
- [3] Cueto, R., Zhang, L., Shan, H.M., Huang, X., Li, X., Lopez, J., ... & Wang, H. (2018). Identification of homocysteine-suppressive mitochondrial ETC complex genes and tissue expression profile-novel hypothesis establishment. *Redox Biol.*, 17, 70-88. doi: 10.1016/j.redox.2018.03.015
- [4] Dobrely, N. V., Boitsova, L. V., & Danova, I. V. (2015). Правова база для проведення етичної експертизи доклінічних досліджень лікарських засобів з використанням лабораторних тварин [Legal basis for ethical examination of preclinical studies of drugs using laboratory animals]. *Фармакологія та лікарська токсикологія - Pharmacology and drug toxicology*, 2, 95-100.
- [5] Dong, Y., Sun, Q., Liu, T., Wang, H., Jiao, K., Xu, J., ... & Wang, W. (2016). Nitrate stress participates in endothelial progenitor cell injury in hyperhomocysteinemia. *PLoS One*, 11(7), e0158672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158672>
- [6] Eyring, K. R., Pedersen, B. S., Maclean, K. N., Stabler, S. P., Yang, I. V., & Schwartz, D. A. (2018). Methylene-tetrahydrofolate reductase contributes to allergic airway disease. *PLoS ONE*, 13(1), e0190916. <https://doi.org/10.1371/journal.pon.0190916>
- [7] Faversani, J. L., Hammerschmidt, T. G., Sitta, A., Deon, M., Wajner, M., & Vargas, C. R. (2017). Oxidative Stress in Homocysteinuria Due to Cystathione β -synthase Deficiency: Findings in Patients and in Animal Model. *Cell Mol Neurobiol*, 37(8), 1477-1485. doi: 10.1007/s10571-017-0478-0
- [8] Goralsky, L. P., Khomich, V. T., & Kononsky, O. I. (2011). *Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології [Fundamentals of histological technique and morphofunctional research methods in normal and pathology]*. Житомир: Полісся - Zhytomyr: Polissya.
- [9] Han, S. H., & Mallampalli, R. K. (2015). The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. *J Immunol.*, 194, 855-860. doi: 10.4049/jimmunol.1402513
- [10] Harutyunyan, A.V., Pustygina, A.V., Milyutina, Yu.P., Zaloznyaya, I.V., & Kozina, A.S. (2015). Молекулярные маркеры окислительного стресса у потомства при экспериментальной гипергомоцистеинемии [Molecular markers of oxidative stress in offspring with experimental hyperhomocysteinemia]. *Молекулярная медицина - Molecular medicine*, 5, 41-46.
- [11] Hasan, T., Arora, R., Bansal, A. K., Bhattacharya, R., Sharma, G. S., & Singh, L. R. (2019). Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. *Exp Mol Med.*, 51(2), 1-13. doi: 10.1038/s12276-019-0216-4
- [12] Hsu, C. C., Cheng, C. H., Hsu, C. L., Lee, W. J., Huang, S. C., & Huang, Y. C. (2015). Role of vitamin B6 status on antioxidant defenses, glutathione and related enzyme activities in mice with homocysteine-induced oxidative stress. *Food Nutr Res.*, 59, 25702. doi: 10.3402/fnr.v59.25702
- [13] Huo, Y., Wu, X., Ding, J., Geng, Y., Qiao, W., Ge, A., ... & Fan, W. (2018). Vascular remodeling, oxidative stress and disrupted PPAR γ expression in rats of long-term hyperhomocysteinemia with metabolic disturbance. *PPAR Res.*, 15, 6738703. doi: 10.1155/2018/6738703
- [14] Jacobsen, N. R., Stoeger, T., van de Brule, S., Saber, A. T., Beyerle, A., Vietti, G., ... & Moller, P. (2015). Acute and subacute pulmonary toxicity and mortality in mice after intratracheal instillation of ZnO nanoparticles in three laboratories. *Food and Chemical Toxicology*, 85, 84-95. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.008
- [15] Kozhemyakin, Yu. M., Khromov, O. S., Boldyreva, N. E., Dobrely, N. V., & Saifetdinova, G. A. (2017). *Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [Scientific and practical recommendations for keeping laboratory animals and working with them]*. Київ: Інтерсервіс - Kyiv: Interservice.
- [16] Lai, W. K., & Kan, M. Y. (2015). Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Ann Nutr Metab.*, 67(1), 1-12. doi: 10.1159/000437098
- [17] Medvedev, D. V., & Zvyagina, V. I. (2017). Молекулярные механизмы токсического действия гомоцистеина [Molecular mechanisms of homocysteine toxicity]. *Кардиологический вестник - Cardiology bulletin*, 1, 52-57.
- [18] Medvedev, D. V., Zvyagina, V. I., Uryasyev, O. M., Belskikh, E. S., Butoletsky, S. V., & Ryabkov, A. N. (2017). Метаболические изменения в митохондриях легких при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс [Metabolic changes in lung mitochondria during experimental hyperhomocysteinemia in rats]. *Биомедицинская химия - Biomedical chemistry*, 3, 248-254.
- [19] Medvedev, D. V., Zvyagina, V. I., & Fomina, M. A. (2014). Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс [A method for modeling severe hyperhomocysteinemia in rats]. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова - Russian medical and biological bulletin named after academician I.P. Pavlova*, 4, 42-46.
- [20] Stanislawska-Sachadyn, A., Borzyszkowska, J., Krzeminski, M., Janowicz, A., Dziadziuszko, R., Jassem, J., ... & Limon, J. (2019). Folate/homocysteine metabolism and lung cancer risk among smokers. *PLoS ONE*, 14(4), e0214462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214462>
- [21] Tolkach, P. G., Basharin, V. A., & Chepur, S. V. (2018). Экспериментальная модель токсического отека легких при ингаляции продуктов пиролиза хлорированного парафина [Experimental model of toxic pulmonary edema upon inhalation of chlorinated paraffin pyrolysis products]. *Токсикологический вестник - Toxicology Bulletin*, 6(153), 8-11.
- [22] Yang, F., Qi, X., Gao, Z., Yang, X., Zheng, X., Duan, C., ... & Zheng, J. (2016). Homocysteine injures endothelial cells by inhibiting mitochondrial activity. *Exp Ther Med.*, 12(4), 2247-2252. doi: 10.3892/etm.2016.3564

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF HISTOLOGICAL CHANGES IN LUNG TISSUE IN RATS OF DIFFERENT AGES UNDER CONDITIONS OF HYPERHOMOCYSTEINEMIA

Samborska I. A.

Annotation. Defeat of the respiratory system is a common phenomenon in today's conditions. Elevated levels of homocysteine (Hz) are one of the predictors of bronchopulmonary pathology. In recent years, there has been an association between its concentration in blood plasma and the risk of developing COPD, bronchial asthma, lung cancer. The pathogenesis of respiratory damage in hyperhomocysteinemia (GHZ) is still being studied, but it is known to be the cause of endothelial dysfunction, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, which underlie lung tissue damage. The aim of the study is to establish a comparative characterization

of histological changes in the lung tissue of rats of different ages at GHZ. The experimental study was performed on 64 white nonlinear male rats. During the experiment, the animals were divided into two groups - control and experimental, each of which is divided into subgroups depending on age - young (1-2 months), mature (6-8 months), old (24-26 months). Simulation of the stable GHZ state was achieved by administering to rats the experimental group thiolactone Hz at a dose of 200 mg/kg body weight intragastrically for 60 days. Histological specimens were studied using an SEO CCAN light microscope and photo-documented using a Vision CCD Camera with an image output system from histological specimens. Histological examinations of the lungs of young animals under GHZ conditions revealed moderate destructive changes of vessels, bronchi, components of the respiratory department, which were compensatory-adaptive and reversible. Adaptive-compensatory and destructive changes of the organ were found in adult rats at experimental GHZ. Older animals develop the most significant destructive-degenerative changes compared with studies of the lungs of groups of young and mature rats. The defining feature for this age group was excessive activation of fibroblasts and the development of perivascular, peribronchial, interstitial sclerosis.

Keywords: hyperhomocysteinemia, vascular remodeling, endothelial dysfunction, emphysema, atelectasis, fibroblasts, sclerosis.
