

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2025-40-3-178-187>
УДК 616.24:576.311.3:546.172.6-31]-78-092.4

Влияние оксида азота (II) на межклеточный матрикс легких в условиях искусственного кровообращения: экспериментальное исследование

Геренг Е.А.¹, Мильто И.В.¹, Серебрякова О.Н.¹, Дзюман А.Н.¹, Бянкина М.А.¹,
Потапов А.В.¹, Каменщиков Н.О.², Кравченко И.В.², Подоксенов Ю.К.²,
Алямкин В.Е.²

¹ Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (СибГМУ Минздрава России), 634050, Российская Федерация, Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (НИИ кардиологии Томского НИМЦ), 634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

Аннотация

Кардиохирургические операции с искусственным кровообращением приводят к существенным изменениям в морфофункциональном состоянии легких, что сопровождается формированием постперфузионного легочного синдрома. Реперфузия многократно усиливает повреждение легких за счет притока кислорода и ионов кальция, а также активированных контактом с материалом контура аппарата лейкоцитов и компонентов свертывающей системы крови. Клетки воспалительного инфильтрата повреждают матриксные белки, выделяя протеолитические ферменты, которые повреждают структуру коллагена и эластина и приводят к образованию их модифицированных форм с измененной пространственной организацией и механическими свойствами. Оксид азота (II) (NO) обладает потенциалом для воздействия на ключевые патогенетические механизмы ишемически-реперфузионного повреждения (ИРП). В условиях искусственного кровообращения (ИК) возникает дефицит эндогенного NO, поэтому периоперационная доставка экзогенного NO, вероятно, способна компенсировать его недостаток и ослаблять ИРП органов.

Цель исследования: охарактеризовать изменения, происходящие в межклеточном матриксе легких в условиях моделирования операций с ИК, оценить влияние периоперационной доставки NO на их выраженность.

Материал и методы. Исследование выполняли на 6 самцах овцы домашней. Животным группы «ИК» ($n = 3$) проводили ИК и ИВЛ по стандартной методике. В группе «ИК + NO» ($n = 3$) овцы дополнительно получали NO (II) в дозе 80 ppm через модифицированные контуры аппаратов искусственной вентиляции легких (ИВЛ) и ИК на протяжении всего эксперимента. Длительность ИК составила 90 мин. Методом иммуногистохимии оценивали содержание в легких матриксных металлопротеиназ-2 и -9. Коллагеновые волокна выявляли с помощью окрашивания по Ван – Гизону и иммуногистохимической реакции на коллаген I типа.

Результаты. В легких овец, получавших NO на фоне ИК, отмечали снижение интенсивности иммунного окрашивания на MMP-2 ($p < 0,001$) и MMP-9 ($p < 0,001$), более высокий удельный объем ($p < 0,001$) и качественные характеристики коллагеновых волокон.

Заключение. Применение NO при экспериментальном моделировании кардиохирургических вмешательств способствует ограничению повреждающего влияния ИК на межклеточный матрикс легких.

Ключевые слова:	оксид азота; NO; искусственное кровообращение; ишемически-реперфузионное повреждение легких; матриксные металлопротеиназы.
Ресурсное обеспечение:	исследование инициировано и проводилось в лаборатории фундаментальных и прикладных морфологических исследований на кафедре морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, а также в НИИ кардиологии Томского НИМЦ.
Финансирование:	работа выполнялась в рамках финансирования лаборатории за 2024 г. (приказ № 76 от 08.02.24 г.), а также в составе государственного задания по фундаментальным научным исследованиям (тема № 122123000017-3).

Геренг Елена Андреевна, e-mail: e-gereng@mail.ru.

Соответствие этики:	протокол проведения исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ по биомедицинской этике (разрешение № 230 от 28 июня 2022 г.).
Для цитирования:	Геренг Е.А., Мильто И.В., Серебрякова О.Н., Дзюман А.Н., Бянкина М.А., Потапов А.В., Каменщиков Н.О., Кравченко И.В., Подоксенов Ю.К., Алямкин В.Е. Влияние оксида азота (II) на межклеточный матрикс легких в условиях искусственного кровообращения: экспериментальное исследование. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2025;40(3):178–187. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2025-40-3-178-187

The effect of nitric oxide (II) on the extracellular matrix of the lungs during cardiopulmonary bypass: an experimental study

Gereng E.A.¹, Byankin M.A.¹, Milto I.V.¹, Serebryakova O.N.¹, Dzuman A.N.¹, Byankina M.A.¹, Kamenshikov N.O.², Kravchenko I.V.², Podoksenov Yu.K.², Alyamkin V.E.²

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC), 111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

² Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (SSMU), 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

Abstract

Cardiac surgeries with cardiopulmonary bypass (CBP) lead to significant changes in the morphofunctional state of the lungs, accompanied by the formation of post-perfusion pulmonary syndrome. Reperfusion significantly increases lung damage due to the influx of oxygen and calcium ions, as well as leukocytes and blood clotting system components activated by contact with the apparatus circuit material. Cells of the inflammatory infiltrate damage matrix proteins by releasing proteolytic enzymes that damage the structure of collagen and elastin and lead to the formation of their modified forms with altered spatial organization and mechanical properties. Nitric oxide (II) (NO) has the potential to affect the key pathogenic mechanisms of ischemic-reperfusion damage. Under cardiopulmonary bypass, there is a deficiency of endogenous nitric oxide, so perioperative delivery of exogenous NO is likely to compensate for this deficiency.

Aim: To characterize the changes occurring in the intercellular matrix of the lungs under the conditions of simulated surgeries with cardiopulmonary bypass and the effect of perioperative delivery of nitric oxide on their severity.

Material and Methods. The study was conducted on 6 male domestic sheep. The animals of the “CBP” group ($n = 3$) underwent CBP and mechanical ventilation (MV) according to the standard procedure. In the “CBP + NO” group ($n = 3$), sheep additionally received nitric oxide (II) at a dose of 80 ppm through modified circuits of ventilators and cardiopulmonary bypass throughout the experiment. The duration of cardiopulmonary bypass was 90 minutes. The content of matrix metalloproteinases-2 and -9 in the lungs was assessed by immunohistochemistry. Collagen fibers were detected by Van – Gieson staining and an immunohistochemical reaction to type I collagen.

Results. In the lungs of sheep treated with nitric oxide on the background of cardiopulmonary bypass, a decrease in the intensity of immune staining for MMP-2 ($p < 0.001$) and MMP-9 ($p < 0.001$), higher specific volume ($p < 0.001$) and qualitative characteristics of collagen fibers were noted.

Conclusion. The use of nitric oxide in experimental modeling of cardiac surgery helps to limit the damaging effect of cardiopulmonary bypass on the intercellular matrix of the lungs.

Keywords:	nitric oxide; NO; cardiopulmonary bypass; ischemic-reperfusion injury of the lungs; matrix metalloproteinases.
Resource support:	the study was initiated and conducted in the Laboratory of Fundamental and Applied Morphological Research at the Department of Morphology and General Pathology of the Siberian State Medical University, as well as the Research Institute of Cardiology of the Tomsk National Medical Research Center.

Funding:	the work was carried out as part of the financing of the laboratory for 2024 (Order No. 76 dated 08.02.24), as well as part of the state assignment for basic scientific research (topic No. 122123000017-3).
Compliance with ethical standards:	the protocol of the study was approved by the local Ethics Committee of the Tomsk Scientific Research Institute of Cardiology for Biomedical Ethics (resolution No. 230 dated June 28, 2022).
For citation:	Gereng E.A., Milto I.V., Serebryakova O.N., Dzuman A.N., Byankin M.A., Potapov A.V., Kamenshikov N.O., Kravchenko I.V., Podoksenov Yu.K., Alyamkin V.E. The effect of nitric oxide (II) on the extracellular matrix of the lungs during cardiopulmonary bypass: an experimental study. <i>Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2025;40(3):178–187. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2025-40-3-178-187

Введение

Нарушение функции внешнего дыхания – распространенное осложнение в кардиохирургии. Разнообразные клинические проявления дисфункции легких в послеоперационном периоде регистрируются у 25% пациентов. Легочные осложнения ухудшают исход операции, увеличивают длительность госпитализации и повышают летальность [1].

Морфологические изменения в легких после кардиохирургического вмешательства получили название «постперфузионный легочный синдром». В основе этой формы острого повреждения легких лежит временное прекращение кровотока по легочным артериям в ходе искусственного кровообращения (ИК), приводящее к ишемически-реперфузионному повреждению (ИРП) органа [2].

Ишемия легких и возникающая клеточная гипоксия приводят к дефициту аденозинтрифосфата, запуску митохондриального пути апоптоза, генерации активных форм кислорода [3]. Поврежденные клетки выделяют молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP), провоспалительные цитокины (интерлейкины IL-1, IL-6, IL-8, фактор некроза опухоли альфа (TNF- α)) [4].

Реперфузия многократно усиливает повреждение легких за счет притока кислорода и ионов кальция [5], а также активированных контактом с материалом контура аппарата ИК лейкоцитов [6] и компонентов свертывающей системы крови [6, 7].

Патологические изменения начинаются в кровеносных сосудах легких. Ключевую роль в развитии постперфузионного синдрома отводят повреждению сосудистого эндотелия [7]. Эндотелиальная дисфункция, возникающая в результате нарушения локальной микроциркуляции, приводит к усиленному тромбообразованию и адгезии лейкоцитов [6]. Скопление тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов в сосудах обуславливает повышение общего легочного сосудистого сопротивления. Адгезия и трансэндотелиальная миграция лейкоцитов способствуют значительному нарушению целостности эндотелиального пласта [8].

Наряду с эндотелием повреждению подвергается и базальная мембрана сосудов. Повреждение альвеоларно-капиллярной мембраны отвечает за вовлечение в патологический процесс легочной паренхимы и является ключевым фактором острого повреждения легких [10].

В научной литературе подробно описаны изменения, которые происходят в эндотелии [6, 10] и альвеоларном эпителии [11]. Однако деструкция матриксных белков альвеоларно-капиллярной мембраны и интерстиция остается малоизученным аспектом постперфузионного легочного синдрома.

В условиях ишемии-реперфузии свободно-радикальное окисление коллагена и эластина приводит к образованию их модифицированных форм с измененной пространственной организацией и механическими свойствами [3].

Клетки воспалительного инфильтрата повреждают матриксные белки, выделяя протеолитические ферменты, такие как эластаза нейтрофилов (NE) и матриксные металлопротеиназы (MMP) [12, 13].

Оксид азота (II) (NO) обладает потенциалом для воздействия на ключевые патогенетические механизмы ИРП [12].

NO как высокоэффективный вазодилататор малого круга кровообращения применяется для снижения сопротивления легочных сосудов, давления в легочной артерии и оптимизации вентиляционно-перфузионного соотношения [8, 14]. Он участвует в регуляции синтеза провоспалительных цитокинов, снижает экспрессию молекул адгезии на лейкоцитах и эндотелии сосудов, ослабляет агрегацию тромбоцитов. Выступая в роли антиоксиданта, NO способен высокоэффективно связывать кислородные радикалы [14–16].

В условиях ИК возникает дефицит эндогенного NO. Снижение синтеза этой молекулы является одним из проявлений эндотелиальной дисфункции [6, 8]. Механический гемолиз приводит к высвобождению гемоглобина, который активно связывает NO в кровотоке [14].

Периоперационная доставка экзогенного NO, вероятно, способна компенсировать его недостаток и ослаблять ИРП органов [14].

В ряде исследований подтверждена эффективность применения NO для периоперационной защиты сердца и почек [8, 14]. Однако количество работ, посвященных пульмопротективному действию NO в условиях ИК, невелико, что и послужило основанием для проведения данного исследования.

Цель исследования: охарактеризовать изменения, происходящие в межклеточном матриксе легких в условиях моделирования операций с ИК, оценить влияние периоперационной доставки NO на их выраженность.

Материал и методы

Экспериментальное исследование проведено на 6 самцах овцы домашней (*Ovis aries*) массой 30–34 кг, распределенных на 2 равные группы методом конвертов. Животным группы «ИК» проводили ИК и искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) по стандартному протоколу. Животные группы «ИК + NO» дополнительно получали NO в дозе 80 ppm через модифицированные контуры аппаратов ИВЛ и ИК на протяжении всего эксперимента.

Все манипуляции выполнены в соответствии с между-

народными стандартами гуманного обращения с животными и директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных.

Методика проведения искусственного кровообращения

Индукция анестезии проводилась ингаляцией севофлурана. После достижения целевого уровня анестезии и предоперационной подготовки производили катетеризацию большой подкожной вены задней конечности. Премедикацию осуществляли хлоропирамином 20 мг и атропина сульфатом 0,5 мг. Для общей анестезии проводили дробную инфузию пропофола 5 мг/кг, для поддержания анестезии пропофол вводили в дозировке 5 мкг/кг/ч.

После прямой ларингоскопии на фоне спонтанного дыхания осуществляли оротрахеальную интубацию с последующим подключением животного к аппарату ИВЛ Puritan Bennett 760 (США). Доставку NO животным группы «ИК + NO» начинали сразу после интубации трахеи через модифицированный контур аппарата ИВЛ.

Нейромышечную блокаду обеспечивали введением пипекурония бромида 0,1 мг/кг. Мониторинг витальных функций выполняли на протяжении всего эксперимента. Он включал в себя ЭКГ-мониторинг, инвазивный контроль артериального давления, пульсоксиметрию, капнометрию, термометрию, оценку диуреза и уровня metHb.

Оперативный доступ осуществляли посредством торакотомии в 4–5-е межреберье справа. ИК выполняли с помощью аппарата ИК Maquet Jostra HL20 и неонатального оксигенатора Kids D100 (Dideco, Италия). Подключение аппарата ИК осуществляли по схеме «аорта – верхняя полая вена – нижняя полая вена». При этом пережатие аорты, наложение турникетов на полые вены и кардиоплегия не выполнялись.

Длительность ИК в обеих группах составила 90 мин. Период реперфузии после перевода животных на естественное кровообращение составил 60 мин. По истечении этого времени производили взятие гистологического материала. На фоне хирургической стадии наркоза животные были гуманно выведены из эксперимента.

Методика доставки оксида азота

В эксперименте использовали прибор AIT-NO-01 («Тиапох»), обеспечивающий плазмохимический синтез NO из атмосферного воздуха. Устройство также осуществляет контроль содержания NO и NO₂ в газовой смеси.

Доставку NO животным группы «ИК + NO» через инспираторную часть контура аппарата ИВЛ начинали сразу после интубации трахеи. В течение всего периода ИК (90 мин) подача NO происходила через газовоздушную магистраль модифицированного экстракорпорального контура. После перевода животных на естественное кровообращение подачу NO продолжали через аппарат ИВЛ в течение 1 ч.

Устройство «Тиапох» подсоединяли к кинспираторной части аппарата ИВЛ и газовоздушной магистрали аппарата ИК посредством двух переходников с разъемом Luер. Через проксимальный переходник осуществляли подачу NO. К дистальному переходнику подключали газоанализатор.

Подаваемую дозу корректировали так, чтобы концентрация NO в газовой смеси составляла 80 ppm. Концентрацию NO₂ поддерживали на уровне, не превышающем

2 ppm. Также производили мониторинг уровня метгемоглобина в крови, максимально допустимой концентрацией считали 5%.

Гистологическое исследование

Через 1 ч после перевода овец на естественное кровообращение отбирали фрагменты крааниальной, средней и каудальной долей правого легкого для гистологического исследования.

Материал фиксировали в течение 24 ч в забуференном 10%-м растворе формалина (Биовитрум, Россия). После фиксации фрагменты легких промывали в проточной воде, обезжовивали в растворе «Изопреп» (Биовитрум, Россия) и заливали в парафиновую смесь «Гистомикс» (Биовитрум, Россия). Из парафиновых блоков с помощью автоматического микротомы Thermo HM 355S (Thermo Fisher Scientific, Китай) готовили срезы толщиной 4–5 мкм.

Срезы депарафинизировали в о-Ксилоле (ЭКОС-1, Россия), регидратировали в этиловом спирте и дистиллированной воде.

Для оценки состояния и количества коллагеновых волокон срезы окрашивали по Ван – Гизону.

Иммуногистохимическое исследование

После депарафинизации и регидратации срезов производили температурную демаскировку антигенов в цитратном буфере PRIME HIER, pH 6 (ПраймБиоМед, Россия).

Для снижения фонового окрашивания на срезы последовательно наносили раствор для блокировки эндогенной пероксидазы (ПраймБиоМед, Россия) и реагент для блокировки неспецифического связывания антител (ПраймБиоМед, Россия).

В качестве первичных антител использовали моноклональные мышинные антитела к MMP-2 и MMP-9 (ThermoScientific, США) в разведении 1 : 400, а также поликлональные кроличьи антитела к коллагену I типа ab244113 (Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000.

Визуализацию результатов иммуногистохимической реакции производили с использованием набора реагентов «Универсальная двухстадийная система детекции PrimeVision (антитела к IgG мыши / кролика – HRP/DAB) для проведения иммуногистохимических исследований» (ПраймБиоМед, Россия).

Ядра клеток докрашивали гематоксилином (ПраймБиоМед, Россия).

Морфометрия и статистическая обработка данных

Окрашенные препараты изучали под световым микроскопом Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали для дальнейшей компьютерной морфометрии.

Морфометрическое исследование проводили при помощи программы «ImageJ», версия 1.54 (NIH, США) на фотографиях не менее чем 10 произвольных полей зрения.

Удельный объем коллагеновых волокон оценивали пороговым методом [12]. Области ярко-малинового оттенка, характерного для коллагена при окрашивании по Ван Гизону, выделяли задавая пороговые значения цветового тона, насыщенности и яркости при помощи инструмента Colour Threshold. Относительная площадь выделенных областей подсчитывалась автоматически.

Для оценки содержания матриксных металлопротеиназ полученные цифровые микрофотографии раскладывали на два 8-bit изображения по векторам гематоксилина (голубые тона) и DAB (кирпично-оранжевые тона) с использованием команды Colour Deconvolution. Позитивно-окрашенные участки на DAB-изображении отделяли от фона, задавая пороговое значение интенсивности цвета с помощью инструмента Threshold. Изображение переводили в бинарное, на котором позитивные участки имеют белый цвет, а фон черный. С использованием команды Analyze Particles определяли количество положительно окрашенных участков, а также их абсолютную и относительную площади.

Исходя из выявленных в ходе исследования особенностей иммуногистохимического окрашивания для оценки интенсивности реакции на MMP-2, использовали относительную площадь иммунопозитивных участков, в случае MMP-9 производили подсчет положительно окрашенных клеток воспалительного инфильтрата.

Для определения количества MMP-9-позитивно окрашенных клеток дополнительно использовали плагин Watershed, который позволяет дифференцировать отдельные клетки в крупных скоплениях, достраивая границы между ними.

С целью обеспечения единообразия результатов иммуногистохимического исследования полученные количественные значения переводили в баллы: 0 – отсутствие реакции; 1 – иммуногистохимическая реакция низкой интенсивности (MMP-2-позитивные участки занимают менее 20% площади среза, менее 20% клеток инфильтрата демонстрируют MMP-9-положительное окрашивание); 2 – умеренная интенсивность иммуногистохимической реакции (положительно окрашенные участки занимают 20–70% среза, или позитивно окрашено 20–70% клеток инфильтрата); 3 – реакция высокой интенсивности (положительно окрашенные области занимают более 70% среза, или более 70% клеток инфильтрата окрашены положительно).

Статистическую обработку полученных данных проводили в пакете программ STATISTICA 12 (StatSoft, США). Количественные показатели в двух независимых группах сравнивали по критерию Манна – Уитни. Критический уровень статистической значимости принимали равным 0,05.

Значимых различий в морфометрических параметрах между разными долями легкого не было выявлено, поэтому долевыми различиями в дальнейшем пренебрегали.

Результаты

Состояние коллагеновых волокон легочного интерстиция

Структурную организацию и количество коллагеновых волокон оценивали на срезах, окрашенных по Ван – Гизону. Выявленные особенности полностью согласуются с результатами иммуногистохимической реакции на коллаген I типа.

Основная масса коллагена была сосредоточена в составе перибронхиальной и периваскулярной стромы легких. Он формировал толстые, концентрически расположенные волокна ярко-красного цвета, указывающего на их зрелость.

В зонах отека фибриллы коллагена набухшие, имеют нечеткие контуры, нередко подвергаются разволокнению и фрагментации (рис. 1).

В межальвеолярном интерстиции коллагеновые волокна расположены рыхло. В легких животных после стандартной процедуры ИК обнаруживали множество эмфизематозно расширенных ацинусов с истонченными стенками. Коллаген в них выявляли в виде тонких, сильно извитых тяжей бледно-розового цвета, имеющих размытые контуры. Отмечали многочисленные разрывы волокон, свободные концы которых выступали в просвет альвеол в виде «бахромки».

Доставка NO была ассоциирована с визуальным снижением количества локусов дезорганизации и фрагментации коллагена. Коллагеновые волокна межальвеолярных перегородок в препаратах этой группы имеют большую толщину и четкие контуры, окрашиваются интенсивнее.

Локализация и интенсивность иммунного окрашивания на MMP-2 и MMP-9

MMP-2 и MMP-9 иммуногистохимически выявлялись в легких овец обеих исследуемых групп.

Иммунное окрашивание на MMP-9 визуальным отличалось высокой интенсивностью. Выраженное положительное окрашивание наблюдали в цитоплазме клеток лимфоплазмоцитарного инфильтрата и альвеолярных макрофагов. Кроме того, слаболожительную реакцию демонстрировали реснитчатые эпителиоциты слизистой оболочки бронхов (рис. 3).

Интенсивность иммуногистохимической реакции на MMP-2 была значительно ниже. MMP-2-позитивные участки локализовались диффузно в межклеточном веществе интерстициальной, перибронхиальной и в особенности периваскулярной стромы легких (рис. 4).

Морфометрическое исследование

Доставка NO приводила к статистически значимому снижению интенсивности иммунного окрашивания на MMP-9 по сравнению с группой, в которой ИК проводили по стандартной методике.

Интенсивность реакции на MMP-2 в группе животных, получавших NO в составе газовой смеси, также была значимо ниже этого показателя в группе «ИК».

Снижение содержания металлопротеиназ в легких исследуемых животных было ассоциировано с большей сохранностью коллагеновых волокон, что морфометрически подтверждается увеличением их удельного объема в легких животных, получавших NO.

Характеристика исследуемых групп и результаты их сравнения приведены в таблице 1.

Обсуждение

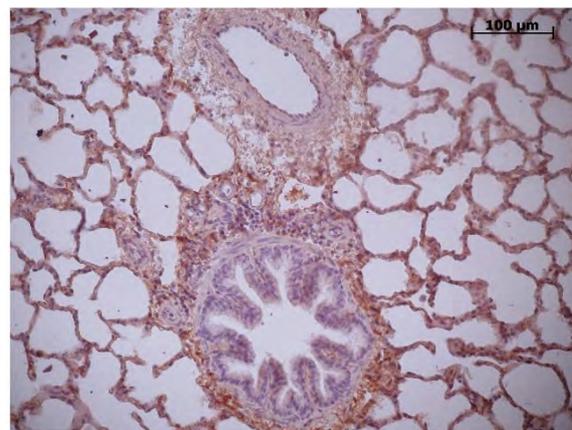
Мы изучили влияние периоперационной доставки NO на изменения, происходящие в межклеточном матриксе легких овец в ходе моделирования операций с ИК.

Согласно данным литературы, острое повреждение легких любой этиологии сопровождается значительным увеличением уровней MMP [16]. Причем наиболее часто в этом контексте упоминаются желатиназы (MMP-9 и -2) [17].

Работ, посвященных участию MMP в патогенезе острого повреждения легких, вызванного ишемией-реперфузией, немного. Однако полученные результаты исследований также показывают увеличение экспрессии MMP-2 и MMP-9, зачастую в сочетании со снижением экспрессии их ингибиторов (TIMP-1 и -2) [13, 19]. Таким образом, при

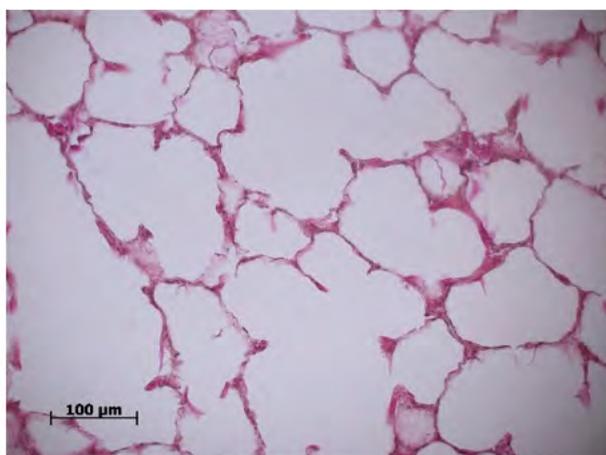


А

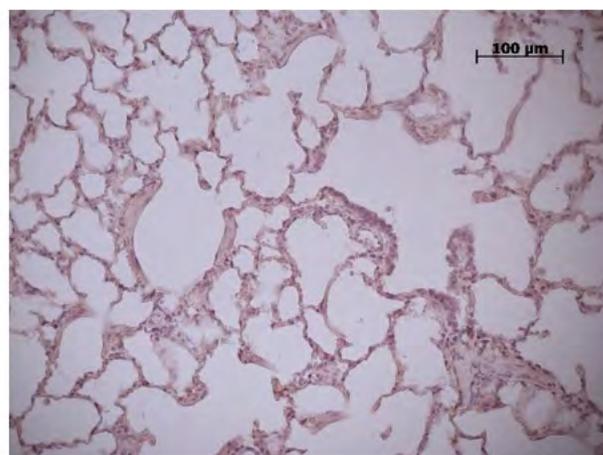


Б

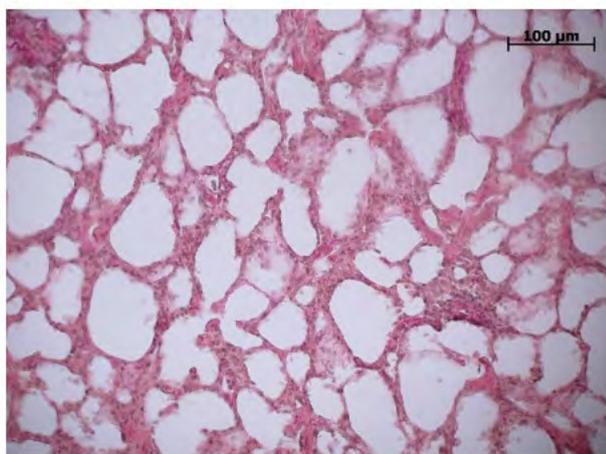
Рис. 1. Фрагмент легкого овцы группы «ИК». Увеличение $\times 200$. Коллагеновые волокна в составе периваскулярной и перибронхиальной стромы. Окрашивание по Ван – Гизону (А). Иммуногистохимическое окрашивание на коллаген I типа (Б)
 Fig. 1. Fragment of a sheep lung of the "CPB" group. Magnification $\times 200$. Collagen fibers in the perivascular and peribronchial stroma. Van – Gieson staining (A). Immunohistochemical staining for type I collagen (B)



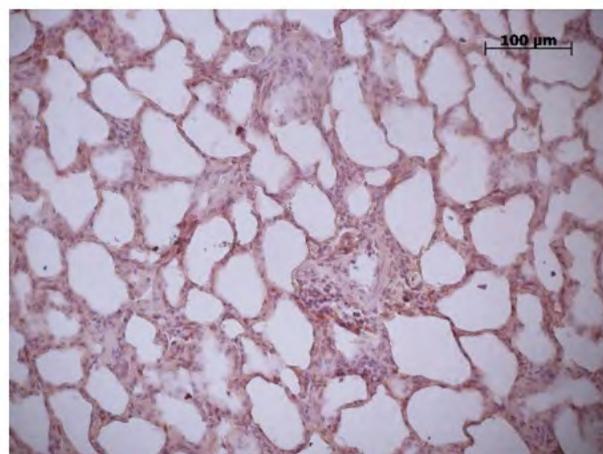
А



Б



В



Г

Рис. 2. Фрагмент легкого овцы. Увеличение $\times 200$. Волокна коллагена в межальвеолярном интерстиции. Группа «ИК» (А, Б). Эмфизематозное расширение ацинусов, истончение и множественные разрывы коллагеновых волокон. Низкая интенсивность окрашивания по Ван – Гизону (А) и иммунного окрашивания на коллаген I типа (Б). Группа «ИК + NO» (В, Г). Увеличение толщины и упорядоченности коллагеновых волокон. Большая интенсивность окрашивания по Ван – Гизону (В) и иммунного окрашивания на коллаген I типа (Г)
 Fig. 2. Fragment of a sheep lung. Magnification $\times 200$. Collagen fibers in the interalveolar interstitium. Group "CPB" (A, B). Emphysematous expansion of the acini, thinning, and multiple breaks in the collagen fibers. Low intensity of Van – Gieson staining (A) and immunostaining for type I collagen (B). Group "CPB + NO" (C, D). Increased thickness and organization of the collagen fibers. High intensity of Van – Gieson staining (C) and immunostaining for type I collagen (D)

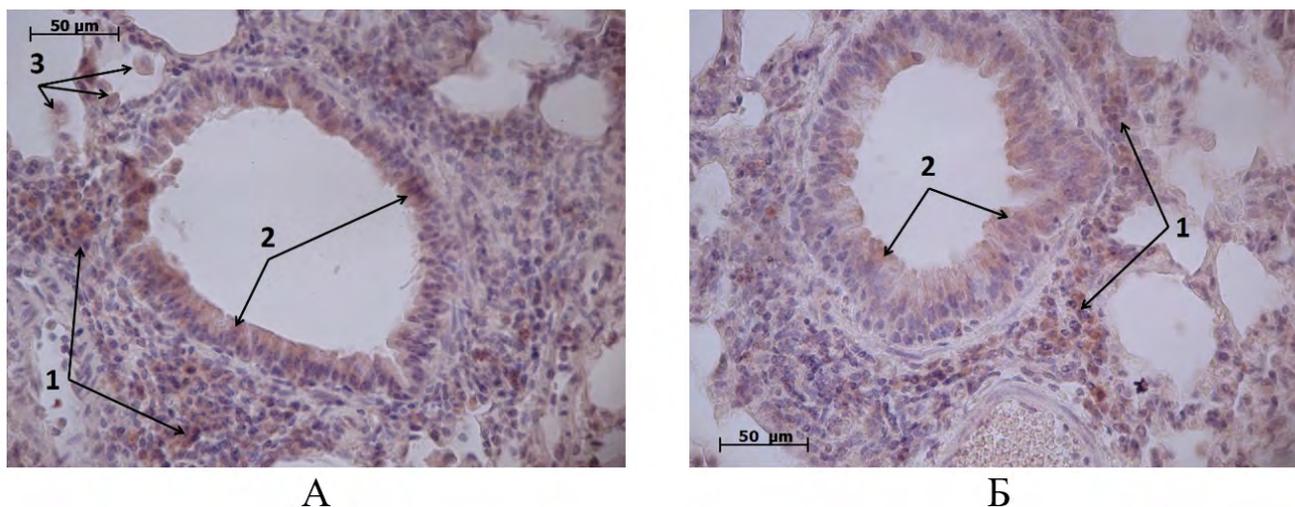


Рис. 3. Фрагмент легкого овцы. Иммуногистохимическая реакция на MMP-9. Увеличение $\times 400$. А – группа «ИК». Выраженное положительное окрашивание в цитоплазме клеток лимфомоноцитарного инфильтрата (1), реснитчатых эпителиоцитов бронхов (2). Слабо положительная реакция в цитоплазме альвеолярных макрофагов (3). Б – группа «ИК + NO». Визуальное снижение интенсивности иммуногистохимической реакции в воспалительном инфильтрате (1) и эпителиоцитах бронхов (2)

Fig. 3. Fragment of a sheep lung. Immunohistochemical reaction to MMP-9. Magnification $\times 400$. А – "CPB" group. Expressed positive staining in the cytoplasm of cells of the lymphomonocytic infiltrate (1), ciliated bronchial epithelia cells (2). Weakly positive reaction in the cytoplasm of alveolar macrophages (3). Б – "CPB + NO" group. Visual decrease in the intensity of the immunohistochemical reaction in the inflammatory infiltrate (1) and bronchial epithelia cells (2)

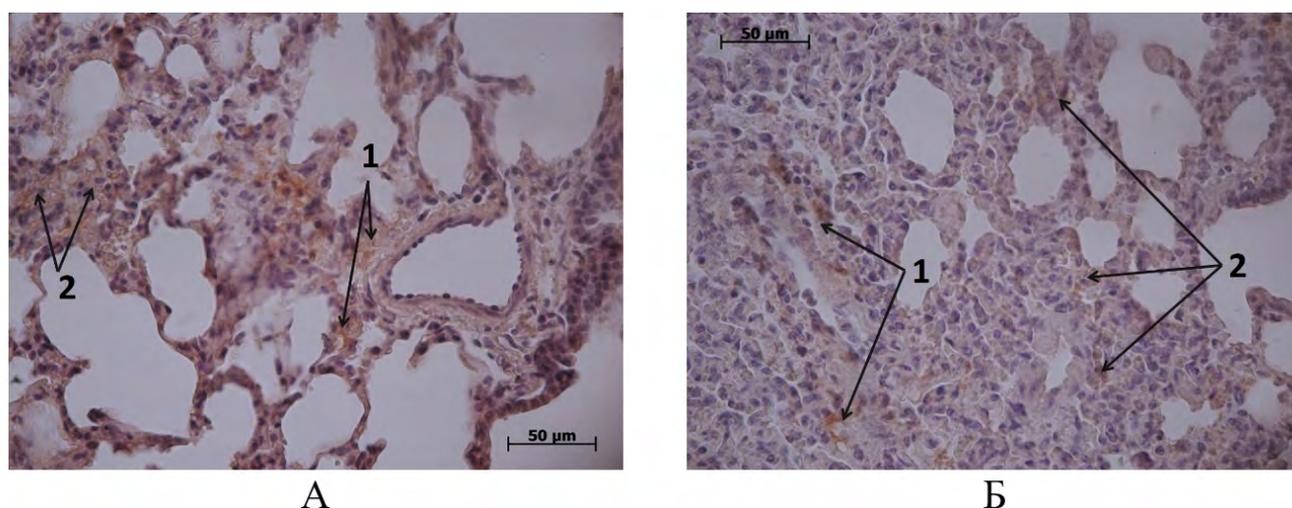


Рис. 4. Фрагмент легкого овцы. Иммуногистохимическая реакция на MMP-2. Увеличение $\times 400$. А – группа «ИК». Диффузное положительное окрашивание в периваскулярной (1) и интерстициальной (2) строме. Б – группа «ИК + NO». Визуальное снижение интенсивности иммуногистохимической реакции в периваскулярной (1) и интерстициальной (2) строме

Fig. 4. Fragment of a sheep's head. Immunohistochemical reaction to MMP-2. Magnification $\times 400$. А – group "CPB". Diffuse positive staining in the perivascular (1) and interstitial (2) stroma. Б – group "CPB + NO". Visual decrease in the intensity of the immunohistochemical reaction in the perivascular (1) and interstitial (2) stroma

Таблица 1. Результаты морфометрического исследования

Table 1. Results of the morphometric study

Показатели	Группы		p
	«ИК», n = 3	«ИК + NO», n = 3	
Интенсивность MMP-9-положительной реакции, значения, баллы	2; 2; 3	0; 1; 1	0,0002
Интенсивность MMP-2-положительной реакции, значения, баллы	1; 1; 1	0; 0; 0	0,0004
Удельный объем коллагеновых волокон, значения, %	15,9; 23, 4; 28,3	8,5; 11,6; 16,8	0,0001

ИРП баланс MMP/TIMP смещается в сторону протеолиза, что ведет к неконтролируемому разрушению структурных белков легких.

В условиях ИРП продукция металлопротеиназ многократно возрастает под влиянием провоспалительных цитокинов [7]. Свободные радикалы активируют металлопротеиназы за счет прямого окислительного разрыва связи Zn-цистеин в активном центре [20].

Результаты нашего исследования подтверждают участие MMP-2 и MMP-9 в ИРП легких в ходе ИК.

Иммуногистохимическая реакция на MMP-9 в легких исследуемых животных отличалась высокой интенсивностью (2–3 балла). Ярко выраженное иммунное окрашивание наблюдали в цитоплазме мононуклеаров воспалительного инфильтрата и альвеолярных макрофагов.

Это согласуется с данными литературы. MMP-9 яв-

ляется ключевой металлопротеиназой воспаления. Ее синтез осуществляют главным образом клетки иммунной системы после их стимуляции цитокинами (TNF- α , IL-13) [13]. При моделировании ИРП на мышах показано, что MMP-9 гиперэкспрессируется в легких наряду с такими воспалительными медиаторами, как IL-8, IL-6, IL-1 β [19].

Другое исследование показало, что содержание MMP-9 в гомогенате легких при ишемии-реперфузии нарастает постепенно после восстановления кровотока [15]. Это подтверждает, что основным источником MMP-9 являются лейкоциты, мигрирующие в легкие на этапе реперфузии.

Особого внимания заслуживает обнаруженная нами позитивная реакция на MMP-9 в цитоплазме реснитчатых эпителиоцитов бронхов. Известно, что эпителиальные клетки способны к продукции MMP-9 в условиях активной стимуляции TNF- α и IL-1 β [16].

Полученные данные о распределении и интенсивности иммунного окрашивания на MMP-9 свидетельствуют об активной воспалительной реакции, развивающейся в ходе ИК и захватывающей как респираторные отделы, так и внутрилегочные воздухоносные пути.

Интенсивность иммуногистохимической реакции на MMP-2 в нашем исследовании была значительно ниже (0–1 балл). Позитивно окрашенные участки локализовались диффузно в интерстиции и чаще всего обнаруживались вокруг кровеносных сосудов.

Описанная локализация соответствует данным литературы о том, что MMP-2 продуцируется фибробластами, гладкомышечными и эндотелиальными клетками. Ее ключевая функция – расщепление коллагена IV типа базальных мембран сосудов [15, 16].

Другим механизмом, объясняющим преимущественно периваскулярное выявление MMP-2, является увеличение проницаемости сосудистой стенки и экстравазация металлопротеиназы из кровотока. Такое предположение высказывают авторы, которые обнаружили резкое увеличение содержания MMP-2 в жидкости бронхоальвеолярного лаважа сразу после индукции ишемии и ее неизменный высокий уровень в период реперфузии [4, 8].

Ученые подчеркивают двойственную роль исследуемых металлопротеиназ в патогенезе острого повреждения легких. В экссудативную фазу отмечают резкое увеличение их концентрации, сопровождающееся значительным повреждением белков альвеолярно-капиллярной мембраны [16, 18].

На поздних стадиях острого повреждения уровни MMP-2 и MMP-9 остаются умеренно повышенными. На первый план выходит их участие в процессах ограничения альтерации и восстановления тканей [20].

Защитное действие металлопротеиназ обусловлено расщеплением ряда хемокинов и провоспалительных цитокинов (в том числе IL-1 β и IL-8) [17].

В отношении фибропролиферативных процессов исследуемые MMP демонстрируют противоположные эффекты. MMP-9 активирует TGF- β , стимулируя синтез соединительной ткани [13]. MMP-2, напротив, расщепляет TGF- β и ослабляет избыточный фиброгенез в стадии восстановления [15].

Периоперационная доставка NO в нашем исследовании приводила к снижению интенсивности иммунного окрашивания на MMP-2 и MMP-9.

Научные данные о влиянии NO на содержание металлопротеиназ в легких при ИРП крайне малочисленны.

Тем не менее, в одном исследовании также показано, что ингаляция NO перед индукцией ишемии предотвращает увеличение содержания MMP-2 в легких [20].

Снижение содержания металлопротеиназ, вероятно, связано с ослаблением инфильтрации легких лейкоцитами, уменьшением выработки провоспалительных цитокинов и защитой эндотелия от повреждения.

Существуют также литературные данные, указывающие на участие NO в непосредственной регуляции активности MMP. В низких наномолярных концентрациях NO активирует металлопротеиназы посредством цГМФ-зависимого пути [18]. Однако микромолярные концентрации NO ингибируют ферментативную активность вследствие образования активных форм азота, взаимодействующих с ионами Zn в активном центре металлопротеиназ. Ингибирование MMP высокими концентрациями NO носит защитный характер, сдерживая разрушение тканей в условиях воспаления [16].

Иммуногистохимическое выявление металлопротеиназ не позволяет нам напрямую оценить их активность. Однако о высокой активности MMP в легких овец после ИК свидетельствуют явные гистологические признаки деструкции коллагеновых волокон легочного интерстиция.

Разрушение коллагена межальвеолярных перегородок приводило к структурным изменениям в респираторном отделе в виде эмфизематозного расширения ацинулов.

Применение NO было ассоциировано с лучшим состоянием коллагеновых волокон: они имели четкие контуры, упорядоченное расположение и меньше локусов фрагментации, интенсивнее окрашивались. Морфометрическое исследование показало, что удельный объем коллагеновых волокон был выше в группе животных, получавших NO.

Увеличение удельного объема коллагеновых волокон под влиянием NO в рамках проведенного нами исследования можно трактовать исключительно как следствие ограничения их деструкции. Временные рамки эксперимента (около 3 ч от начала эксперимента до взятия гистологического материала) охватывают только начальные стадии повреждения, тогда как для развития фибропролиферативных процессов необходимы более длительные сроки.

Заключение

Доставка NO при моделировании кардиохирургических операций с ИК, возможно, приводит к снижению содержания матриксных металлопротеиназ (MMP-2 и MMP-9), а также ослабляет деструкцию коллагеновых волокон межклеточного матрикса в легких экспериментальных животных.

Литература / References

1. Fischer M.O., Brotons F., Briant A.R., Suehiro K., Gozdzik W., Sponholz C. et al. Postoperative pulmonary complications after cardiac surgery: The VENICE International Cohort Study. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2022;36(8):2344–2351. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2021.12.024>.
2. Yuan S.M. Postperfusion lung syndrome: pathophysiology and therapeutic options. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* 2014;29(3):414–425. <https://doi.org/10.5935/1678-9741.20140071>.
3. Ferrari R.S., Andrade C.F. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015;2015:590987. <https://doi.org/10.1155/2015/590987>.
4. Giacinto O., Satriano U., Nenna A., Spadaccio C., Lusini M., Mastroianni C. et al. Inflammatory response and endothelial dysfunction following cardiopulmonary bypass: pathophysiology and pharmacological targets.

- Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug. Discov.* 2019;13(2):158–173. <https://doi.org/10.2174/1872213X13666190724112644>.
- Wang S., Griffith B.P., Wu Z.J. Device-Induced Hemostatic Disorders in Mechanically Assisted Circulation. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2021;27:1076029620982374. <https://doi.org/10.1177/1076029620982374>.
 - Ta H.Q., Kuppusamy M., Sonkusare S.K., Roeser M.E., Laubach V.E. The endothelium: gatekeeper to lung ischemia-reperfusion injury. *Respir. Res.* 2024;25(1):172. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02776-4>.
 - Куликов О.А., Балашов В.П., Агеев В.П., Семенова Е.В., Шляпкина В.И., Замышляев П.С. и др. Морфология легких при экспериментальном остром повреждении и его фармакокоррекции. *Морфологические ведомости.* 2020;28(2):64–73. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(2\):64-73](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(2):64-73).
 - Kulikov O.A., Balashov V.P., Ageev V.P., Semenova E.V., Shljapina V.I., Zamyshlyayev P.S. The morphology of the lungs at the experimental acute injury and its pharmacocorrection. *Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter.* 2020;28(2):64–73. (In Russ.). [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(2\):64-73](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(2):64-73).
 - Kamenshchikov N.O., Podoksenov Y.K., Kozlov B.N., Maslov L.N., Mukhomedzyanov A.V., Tyo M.A. et al. Potential mechanisms for organoprotective effects of exogenous nitric oxide in an experimental study. *Biomedicines.* 2024;12(6):12. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061298>.
 - Yan Y., Kamenshchikov N., Zheng Z., Lei C. Inhaled nitric oxide and postoperative outcomes in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide.* 2024;146:64–74. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2024.03.004>.
 - Andrabi S.M., Sharma N.S., Karan A., Shatil S.M., Cordon B., Ma B. et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. *Adv. Sci. (Weinh).* 2023;10(30):e2303259. <https://doi.org/10.1002/adv.202303259>.
 - Bhirowo Y.P., Raksawardana Y.K., Setianto B.Y., Sudadi S., Tandean T.N., Zaharo A.F. et al. Hemolysis and cardiopulmonary bypass: meta-analysis and systematic review of contributing factors. *J. Cardiothorac. Surg.* 2023;18(1):291. <https://doi.org/10.1186/s13019-023-02406-y>.
 - Baidoo N., Crawley E., Knowles C.H., Sanger G.J., Belai A. Total collagen content and distribution is increased in human colon during advancing age. *PLoS One.* 2022;17(6):e0269689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269689>.
 - Пруткина Е.В., Сепп А.В., Цыбиков Н.Н. Особенности синтеза матриксной металлопротеиназы-9 в легких при развитии дистресс-синдрома в эксперименте. *Acta Biomedica Scientifica.* 2013;1(89):121–124. URL: <https://www.actabiomedica.ru/jour/article/view/1417/1364> (08.09.2025).
 - Prutkina E.V., Sepp A.V., Cybikov N.N. Peculiarities of synthesis of matrix metalloproteinase-9 in the lungs during experimental development of distress syndrome. *Acta Biomedica Scientifica.* 2013;1(89):121–124. (In Russ.). URL: <https://www.actabiomedica.ru/jour/article/view/1417/1364> (08.09.2025).
 - Kamenshchikov N.O., Safaee Fakhr B., Kravchenko I.V., Dish A.Y., Podoksenov Y.K., Kozlov B.N. et al. Assessment of continuous low-dose and high-dose burst of inhaled nitric oxide in spontaneously breathing COVID-19 patients: A randomized controlled trial. *Nitric Oxide.* 2024;149:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2024.06.003>.
 - Zhou P., Song N.C., Zheng Z.K., Li Y.Q., Li J.S. MMP2 and MMP9 contribute to lung ischemia-reperfusion injury via promoting pyroptosis in mice. *BMC Pulm. med.* 2022;22(1):230. <https://doi.org/10.1186/s12890-022-02018-7>.
 - Григоркевич О.С., Мокров Г.В., Косова Л.Ю. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2019;2:3–16. <https://doi.org/10.24411/2587-7836-2019-10040>.
 - Grigorkevich O.S., Mokrov G.V., Kosova L.Ju. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2019;2:3–16. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/2587-7836-2019-10040>.
 - Qu L.C., Jiao Y., Jiang Z.J., Song Z.P., Kang L., Peng Q.H. Expression pattern of matrix metalloproteinase 9 in ischemia-reperfusion-induced acute lung injuries. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2018;11(11):12048–12058. ISSN:1940-5901/IJCEM0080064.
 - Smigiel K.S., Parks W.S. Matrix Metalloproteinases and Leukocyte Activation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017;147:167–195. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.01.003>.
 - Waldow T., Witt W., Buzin A., Ulmer A., Matschke K. Prevention of ischemia/reperfusion-induced accumulation of matrix metalloproteinases in rat lung by preconditioning with nitric oxide. *J. Surg. Res.* 2009;152(2):198–208. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.03.014>.
 - Prado A.F., Batista R.M., Tanus-Santos J.E., Gerlach R.F. Matrix Metalloproteinases and Arterial Hypertension: Role of Oxidative Stress and Nitric Oxide in Vascular Functional and Structural Alterations. *Biomolecules.* 2021;11(4):585. <https://doi.org/10.3390/biom11040585>.

Информация о вкладе авторов

Геренг Е.А. – написание некоторых разделов статьи; Мильто И.В. – разработка дизайна исследования, проведение статистической обработки результатов, написание некоторых разделов статьи; Серебрякова О.Н. – осуществление эксперимента, контроль выполнения гистологических методов исследования; Дзюман А.Н. – осуществление эксперимента, контроль выполнения морфометрических методов исследования; Бянкина М.А. – проведение гистологического исследования; Потапов А.В. – написание некоторых разделов статьи; Каменщиков Н.О. – написание некоторых разделов статьи; И.В. Кравченко осуществление эксперимента; Подоксенов Ю.К. – написание некоторых разделов статьи; Алямкина В.Е. – осуществление эксперимента.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Сведения об авторах

Геренг Елена Андреевна, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия, e-mail: e-gereng@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0001-7226-0328>.

Мильто Иван Васильевич, д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой морфологии и общей патологии, СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия, e-mail: milto_bio@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-9764-4392>.

Серебрякова Ольга Николаевна, ассистент кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия, e-mail: oserebryakovan@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0002-2924-0724>.

Дзюман Анна Николаевна, канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия, e-mail: dzyman@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0795-0987>.

Information on author contributions

Gereng E.A. – article writing; Milto I.V. – study design, statistical processing of results, article writing; Serebryakova O.N. – conducting an experiment, implementation of histological research methods; Dzuman A.N. – conducting an experiment, implementation of morphometric research methods; Byankina M.A. – conducting histological research methods; Kamenshchikov N.O. – article writing; Kravchenko I.V. – conducting the experiment; Podoksenov Yu.K. – article writing; Alyamkin V.E. – carried out the experiment.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Information about the authors

Elena A. Gereng, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor of the Department of Morphology and General Pathology, SSMU, Tomsk, Russia, e-mail: e-gereng@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0001-7226-0328>.

Ivan V. Milto, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head of the Department of Morphology and General Pathology, SSMU, Tomsk, Russia, e-mail: milto_bio@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-9764-4392>.

Olga N. Serebryakova, Assistant, Department of Morphology and General Pathology, SSMU, Tomsk, Russia, e-mail: oserebryakovan@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0002-2924-0724>.

Anna N. Dzyuman, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Morphology and General Pathology, SSMU, Tomsk, Russia, e-mail: dzyman@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0795-0987>.

Бянкина Мария Александровна, студент 6-го курса, медико-биологический факультет, СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия, e-mail: byankina_masha@mail.ru; <http://orcid.org/0009-0005-4632-7396>.

Потапов Алексей Валерьевич, д-р мед. наук, профессор, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия, e-mail: potalex@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0468-3959>.

Каменщиков Николай Олегович, канд. мед. наук, заведующий лабораторией медицины критических состояний, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: Nikolajkamenof@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0003-4289-4439>.

Кравченко Игорь Валерьевич, младший научный сотрудник, лаборатория медицины критических состояний, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: kravchenko27.10.94@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0003-0841-4673>.

Подоксенов Юрий Кириллович, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, отделение сердечно-сосудистой хирургии; ведущий научный сотрудник, лаборатория медицины критических состояний, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: uk@cardio-tomsk.ru; <http://orcid.org/0000-0002-8939-2340>.

Алямкин Вадим Евгеньевич, клинический ординатор, отделение сердечно-сосудистой хирургии, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: vea@cardio-tomsk.ru; <http://orcid.org/0000-0002-6593-0976>.

Maria A. Biankina, Sixth-year student, Faculty of Medicine and Biology, SSMU, Tomsk, Russia, e-mail: byankina_masha@mail.ru; <http://orcid.org/0009-0005-4632-7396>.

Alex V. Potapov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, SSMU, Tomsk, Russia, e-mail: potalex@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0468-3959>.

Nikolay O. Kamenshchikov, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Critical Condition Medicine, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: Nikolajkamenof@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0003-4289-4439>.

Igor V. Kravchenko, Junior Research Scientist, Laboratory of Critical Care Medicine, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: kravchenko27.10.94@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0003-0841-4673>.

Yuri K. Podoksenov, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Department of Cardiovascular Surgery, Senior Research Scientist, Laboratory of Critical Care Medicine, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: uk@cardio-tomsk.ru; <http://orcid.org/0000-0002-8939-2340>.

Vadim E. Alyamkin, Clinical Resident, Department of Cardiovascular Surgery, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: vea@cardio-tomsk.ru; <http://orcid.org/0000-0002-6593-0976>.

Поступила 20.05.2025;
рецензия получена 13.06.2025;
принята к публикации 27.08.2025.

Received 20.05.2025;
review received 13.06.2025;
accepted for publication 27.08.2025.