

УДК 616.24-005.98:616.155.34

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ АЛЬФА-ДЕФЕНЗИНОВ В ЛЕГКИХ ПРИ РЕСПИРАТОРНОМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

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

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Чита, e-mail: lenap75@mail.ru

На нелинейных крысах-самцах воспроизводили острый респираторный дистресс-синдром по оригинальной методике. Животным путем пункции трахеи вводили лизат 45–55 тысяч крысиных нейтрофилов в 0,2 мл 0,9% раствора хлорида натрия (способ защищен патентом РФ). В каждую стадию развития синдрома методом иммуногистохимии определяли экспрессию α -дефензинов различными клетками в легких. Показали, что α -дефензины экспрессируют нейтрофилы, макрофаги и альвеолоциты. Обнаружили, что наибольший уровень экспрессии во все стадии синдрома характерен для нейтрофилов. В экссудативную фазу ОРДС экспрессия α -дефензинов нейтрофилами и макрофагами самая значительная, в пролиферативную фазу она вдвое уменьшается, и наименьшая – в фибротическую. Экспрессия пептидов альвеолоцитами во все стадии остается неизменной.

Ключевые слова: экспериментальный респираторный дистресс-синдром, α -дефензины, клетки легких

ANALYSIS OF EXPRESSION OF ALPHA-DEFENSINS IN THE LUNGS IN THE EXPERIMENTAL RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

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

¹Chita State Medical Academy, Chita, e-mail: lenap75@mail.ru

Acute Respiratory Distress Syndrome was reproduced in the non-linear male rats by the original method. The animals were injected lysate 45–55 thousand rat neutrophils in 0,2 ml 0,9% sodium chloride solution by puncture of the trachea (method patented RF). At each stage of the syndrome development the expression of alpha-defensins by different cells in the lung was determined by immunohistochemistry. It was shown that alpha-defensins expressed neutrophils, macrophages and alveolocytes. It was found that the highest level of expression in all stages of the syndrome was characteristic of neutrophils. In the erythema phase of ARDS expression of alpha-defensins by neutrophils and macrophages was the most significant, in the proliferative phase it was halved and in fibrotic it was the smallest. Expression of peptides by alveolocytes remained unchanged in all stages.

Keywords: experimental respiratory distress syndrome, alpha-defensins, lung cells

Несмотря на активное изучение, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) остается одной из основных проблем современной реаниматологии. В связи с большим количеством и гетерогенностью причин механизмы развития синдрома изучены недостаточно, что затрудняют диагностику процесса, особенно его начальной стадии – фазы острого повреждения легких (ОПЛ). Основным звеном патогенеза ОПЛ является выраженная адгезия нейтрофилов к эндотелию сосудов малого круга кровообращения и инфильтрация ими паренхимы легких [4]. В итоге происходит гиперактивация полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) с высвобождением ферментов азурофильных гранул (эластазы, металлопротеиназы и др.) в экстраклеточное пространство. Вклад в развитие ОПЛ/ОРДС дисбаланса между секрецией нейтрофилами протеаз и их ингибированием активно изучается [1, 4, 9], при этом в тени остается роль таких многофункциональных пептидов, как дефензины.

Катионные антимикробные пептиды – α -дефензины – составляют 30–50% от общего содержания белка азурофильных гранул ПМЯЛ, также они обнаружены в НК-клетках, Т- и В-лимфоцитах, макрофагах, эпителиальных клетках [2]. Дефензины

обладают микробицидным эффектом, участвуют в иммунных реакциях, репарации, свертывании крови. Исследование их в качестве потенциальных «антибиотиков животного происхождения» показало, что пептиды обладают неоднозначными дополнительными эффектами: оказывают токсическое действие в отношении собственных как трансформированных, так и неизмененных клеток [2, 3, 6, 8].

Изучение динамики содержания α -дефензинов в крови в качестве возможного предиктора развития ОРДС дало неоднозначные результаты. Одни исследования свидетельствуют о повышении концентрации пептидов, которое авторы связывают с развитием системной воспалительной реакции [2]; другие, напротив, выявили разнонаправленные сдвиги, вплоть до уменьшения их содержания [5]. В связи с чем роль дефензинов в патогенезе респираторного дистресс-синдрома требует уточнения, при этом более точное представление можно получить, исследуя экспрессию пептидов непосредственно в месте развития процесса, т.е. в легких.

Цель работы: определить экспрессию α -дефензинов различными клетками в легких в зависимости от стадии развития экспериментального ОПЛ/ОРДС.

Материал и методы исследования

Модель ОПЛ/ОРДС воспроизводили по оригинальной методике на половозрелых нелинейных крысах-самцах, для чего животным путем пункции трахеи однократно вводили лизат 45–55 тысяч крысиных нейтрофилов в 0,15–0,20 мл физиологического раствора (заявка на изобретение РФ № 2010130728/14, решение о выдаче патента от 31.01.2012). Животных выводили из эксперимента путем передозировки кетамина на 1 ($n = 25$), 3 ($n = 21$) и 6 ($n = 19$) сутки эксперимента. Развитие ОПЛ/ОРДС во всех случаях подтверждали морфологически.

Иммуногистохимическое исследование выполнялось с использованием парафиновых срезов легочной паренхимы. Для определения экспрессии α -дефенинов использовали первичные антитела фирмы «Nucult biotech» (Нидерланды) в рабочем разведении 1:250. В качестве хромогена применялся 3,3-диаминобензидина тетрагидрохлорид, входящий в коммерческий набор детекции SPD-125 («Spring bioscience», США). Дополнительная докраска клеточных ядер производилась раствором гематоксилина Гarrisона. Оценка экспрессии искомым антигеном проводилась с использованием светового микроскопа Olympus Sx 41. Уровень экспрессии α -дефенинов в исследуемом срезе определялся для всех продуцирующих клеток раздельно: производился подсчет не менее 100 целевых клеточных элементов, в 10 случайно выбранных полях зрения. В каждом поле зрения количественная оценка уровня экспрессии антигена оценивалась в баллах по следующей шкале. Экспрессия считалась отрицательной, 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].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ BIOSTAT версии 3.03. При сравнении групп использовался критерий χ^2 , различия считали значимыми при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде процентного содержания по отношению к исследованному числу полей зрения в срезе.

Результаты исследования и их обсуждение

При развитии экспериментального ОПЛ/ОРДС α -дефенины в разной степени экспрессировали 3 вида клеток: нейтрофилы, макрофаги и альвеолоциты.

В первые сутки эксперимента определялась острая (экссудативная) стадия развития синдрома, морфологический эквивалент непосредственно ОПЛ [4], которая характеризовалась проявлениями «острого неинфекционного диффузного альвеолита», с накоплением в просвете альвеол нейтрофилов, мононуклеарных клеток и других клеточных элементов, десквамированных эпителиоцитов, отечной жидкости. В просвете сосудов отмечались множественные нейтрофильно-лейкоцитарные агрегаты. Наблюдался выход и накопление эритроцитов в просвете альвеол. На этом фоне наибольшая экспрессия α -дефенинов отмечалась нейтрофилами (84% полей зрения суммарно), в меньшей степени макрофагами (57% полей зрения) и наименее выраженная – альвеолоцитами (17% полей зрения) (рис. 1, табл. 1).

Таблица 1

Уровень экспрессии α -дефенинов в 1 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
Нейтрофилы	16,3	72,5	11,2	
Макрофаги	42,6	53,7	3,7	$p = 0,000^*$
Альвеолоциты	82,5	17,5	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,000^*$

Примечания:

p – значение различий в сравнении с нейтрофилами;

p_1 – значение различий в сравнении с макрофагами; * – значимые различия.

На 3 сутки эксперимента в легких микроскопически отмечалось разрешение от отека, регистрировались признаки миграции мононуклеарных клеток, пролиферации фибробластов и синтеза коллагена, что является характерным для пролиферативной фазы ОРДС [4]. В эту стадию синдрома содержание α -дефенинов по-прежнему наибольшим оставалось в ПМЯЛ, 68% полей зрения (табл. 2), но оно было значимо ниже, чем в 1 фазу процесса ($p = 0,001$). Экспрессия пептидов макрофагами, так же как и в 1 стадию ОПЛ/ОРДС, была меньшей, чем нейтрофилами (около 33% полей

зрения), и значимо уменьшалась при сравнении с ее интенсивностью в начале процесса ($p = 0,003$). Содержание α -дефенинов в альвеолоцитах было наименьшим и не изменялось по сравнению с 1 фазой ($p = 0,06$) (рис. 2).

На 6 сутки от момента введения лизата в легких животных отмечались морфологические маркеры фибротической фазы ОРДС: увеличение объема соединительной ткани в интерстиции; изменения в интимае артериол в виде гипертрофии мышечного слоя, иногда вплоть до их полной облитерации; появление гиалиновых мембран

[4]. В эту стадию экспрессия α -дефензинов всеми клетками была наименьшей, а ее уровень в макрофагах и альвеолоцитах стал одинаковым (табл. 3). При этом в сравне-

нии со 2-й фазой ОПЛ/ОРДС содержание пептидов в макрофагах уменьшилось почти вдвое ($p = 0,000$), а их содержание в альвеолоцитах осталось прежним ($p = 0,25$).

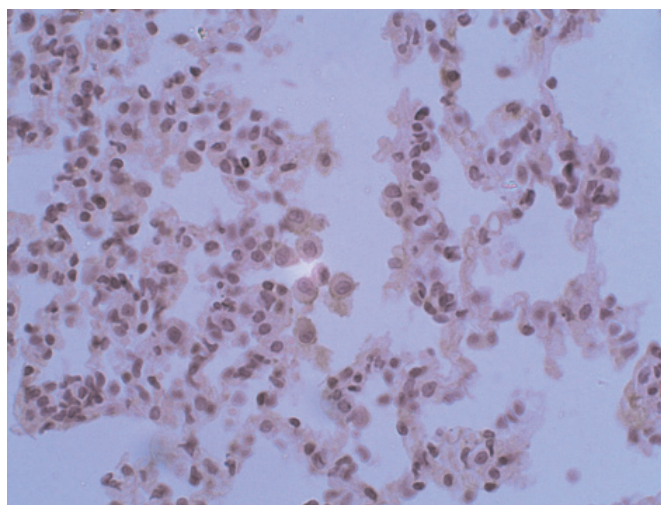


Рис. 1. Микрофото легочной паренхимы: острая (экссудативная) стадия процесса: накопление воспалительного клеточного инфильтрата, представленного преимущественно мононуклеарами с примесью сегментоядерных нейтрофилов, десквамированных альвеолоцитов. Иммуногистохимическое окрашивание, хромоген – продукты реакции с диаминобензидином (позитивные элементы коричневого цвета), фоновое докрасивание гематоксилином Гаррисона. Увеличение $\times 200$

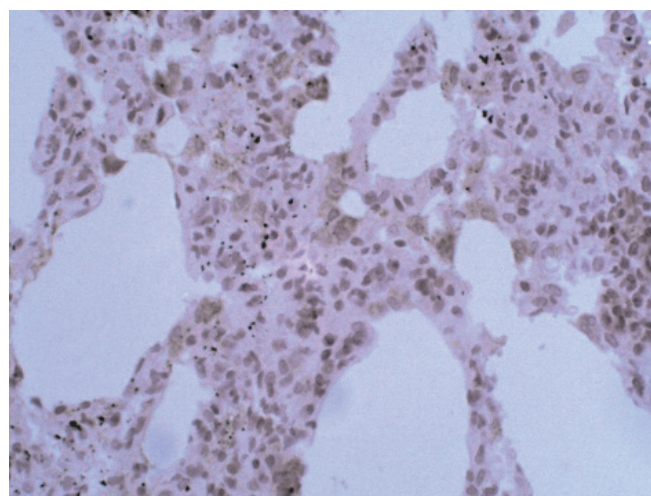


Рис. 2. Микрофото легочной паренхимы: ранняя пролиферативная фаза: разрешение от отека, миграция мононуклеарных клеток и пролиферации фибробластов. Иммуногистохимическое окрашивание, хромоген – продукты реакции с диаминобензидином (позитивные элементы коричневого цвета), фоновое докрасивание гематоксилином Гаррисона. Увеличение $\times 400$

Таблица 2

Уровень экспрессии α -дефензинов во 2-ю 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
Нейтрофилы	32,2	43,2	24,6	
Макрофаги	66,7	30,8	2,5	$p = 0,000^*$
Альвеолоциты	81,7	18,3	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,013^*$

Примечания: те же, что к табл. 1.

Таблица 3

Уровень экспрессии α -дефензинов в 3-ю фазу ОПЛ/ОРДС ($n = 19$, 190 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1–2 балла (% полей зрения)	3–4 балла (% полей зрения)	Значение различий
Нейтрофилы	75,8	20,8	3,4	
Макрофаги	88,3	11,7	0	$p = 0,015^*$
Альвеолоциты	89,2	10,8	0	$p = 0,011^*$ $p_1 = 0,98$

Примечания: те же, что к табл. 1.

Полученные результаты свидетельствуют об участии α -дефензинов в патогенезе всех трех стадий развития ОПЛ/ОРДС. Известно, что дефензины, помимо микробцидной активности, обладают как про- так и противовоспалительными эффектами, вектор которых зависит от концентрации [2, 3, 8]. В 1 стадию процесса – фазу собственно ОПЛ – нами зафиксирована наибольшая локальная экспрессия α -дефензинов как за счет нейтрофилов (в большей степени), так и макрофагов. В этот момент в интерстициальном пространстве создавалась высочайшая концентрация дефензинов, сопряженная с их повреждающими эффектами. Доказано, что при достижении уровня более 50 мкг/мл α -дефензины индуцируют высвобождение ИЛ-8 и нейтрофил-активирующего белка 78 из эпителиальных клеток дыхательных путей, что приводит к дополнительному рекрутированию ПМЯЛ в очаг воспаления [2]. Избыточная аккумуляция нейтрофилов в легочной паренхиме и капиллярах приводит к формированию локального «протеазного взрыва» с повреждением компонентов сурфактанта, базальной мембраны альвеол, эндотелиоцитов. Кроме того, α -дефензины в высокой концентрации повышают проницаемость микроциркуляторного русла как на прямую, так и путем стимуляции дегрануляции тучных клеток [2, 3, 8]. Указанные механизмы в итоге приводят к выходу жидкой части крови в альвеолы и формированию отека легких.

Несмотря на уменьшение по сравнению с предыдущей фазой, в пролиферативную стадию ОРДС экспрессия α -дефензинов оставалась достаточно высокой: в 70% полей зрения по-прежнему регистрировались позитивные нейтрофилы и в 30% – макрофаги (табл. 2). Этот сдвиг, вероятно, приводит к торможению смены субпопуляций лейкоцитов в очаге воспаления легочной паренхимы (нейтрофилы продолжают кумулироваться), в итоге повреждение азрогематического барьера усугубляется.

На 6 сутки эксперимента α -дефензины экспрессировались нейтрофилами почти в четверти полей зрения, а также в равной

степени макрофагами и альвеолоцитами (около 12% полей зрения). Ранее сообщалось, что α -дефензины в малых концентрациях являются фиброгенными медиаторами и участвуют в патогенезе идиопатического нейтрофил-индуцированного фиброза легких, стимулируя синтез коллагена и его молекулярного шаперона HSP 47 фибробластами органа [10]. На наш взгляд, этот механизм и является основным триггером развития фибротической фазы ОРДС.

Невысокая экспрессия α -дефензинов альвеолоцитами во все стадии процесса, скорее всего объясняется тем, что основными антимикробными пептидами, которые синтезируют эпителиальные клетки респираторного тракта, являются β -субсемейство дефензинов [1]. Конститутивный тип синтеза α -дефензинов альвеолоцитами, скорее всего, является достаточным для антибактериального эффекта против попадаемых с воздухом микроорганизмов и предохраняет эпителий от самоповреждения.

Выводы

1. При экспериментальном ОПЛ/ОРДС в легких α -дефензины экспрессируют нейтрофилы, макрофаги и альвеолоциты.

2. В экссудативную фазу ОРДС (собственно ОПЛ) экспрессия α -дефензинов нейтрофилами и макрофагами самая значительная, в пролиферативную фазу она вдвое уменьшается, в фибротическую – наименьшая.

3. Наибольший уровень экспрессии во все стадии синдрома характерен для нейтрофилов. Экспрессия пептидов альвеолоцитами во все стадии остается неизменной.

Список литературы

1. Аверьянов А.В., Поливанова А.Э. Нейтрофильная эластаза и болезни органов дыхания // Пульмонология. – 2006. – №5. – С. 74–79.
2. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дефензины – мультифункциональные катионные пептиды человека // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – №2. – С. 31–40.
3. Катионные противомикробные пептиды как молекулярные факторы иммунитета / В.Н. Кокряков [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – №2. – С. 98–105.

4. Острый респираторный дистресс-синдром: Практическое руководство / под ред. Б.Р. Гельфанда, В.Л. Кассиля-М.: Литтера, 2007. – 232 с.
5. Содержание дефензинов в крови при пневмониях у больных гриппом А/Н1N1 / Е.Н. Романова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, №3. – С. 239–242.
6. Antibacterial activity and specificity of the six human α -defensins / B. Ericksen [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49, №1. – P. 269–275.
7. Imatinib mesylate inhibits cell invasion of malignant peripheral nerve sheath tumor induced by platelet-derived growth factor-BB / M. Aoki [et al.] // *Laboratory Investigation*. – 2007. – Vol. 87. – P. 767–779.
8. Human defensins / J.J. Schneider [et al.] // *J. Mol. Med.* – 2005. – Vol. 83, №8. – P. 587–595.
9. Lee W.L., Downey G.P. Leukocyte elastase physiological functions and role in acute lung injury // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 164. – P. 896–904.
10. Sumako Yoshioka, Hiroshi Mukae, Hiroshi Ishii. Alpha-defensin enhances expression of HSP 47 and collagen-1 in human lung fibroblasts // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 20. – 17367817.

References

1. Aver'janov A.V., Polivanova A.Je., *Pul'monologija*, 2006, no. 5, pp. 74–79.
2. Budikhina A.S., Pinegin B.V., *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*, 2008, no.2, pp. 31–40.
3. Kokrjakov V.N., Koval'chuk L.V., Aleshina G.M., Shamova O.V. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*, 2006, no. 2, pp. 98–105.

4. Gel'fand B.R., Kassil' V.L. *Ostryj respiratornyj distress-sindrom* [Acute respiratory distress syndrome] Moscow, Littera, 2007. 232 p
5. Romanova E.N., Govorin A.V., Gorbunov V.V., Lukjyanov S.A., *Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 239–242.
6. Ericksen B., Zhibin Wu, Lu W., Lehrer R.I., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005, vol. 49, no. 1, pp. 269–275.
7. Aoki M., Nabeshima K., Koga K., Hamasaki M., Suzumiya Ju., Tamura K., Iwasaki H., *Laboratory Investigation*, 2007, vol.87, pp. 767–779.
8. Schneider J.J., Unholzer A., Schaller M., Schäfer-Korting M., Korting H.C. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2005, vol.83, no. 8, pp. 587–595.
9. Lee W.L., Downey G.P., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, vol. 164, pp. 896–904.
10. Sumako Yoshioka, Hiroshi Mukae, Hiroshi Ishii. Alpha-defensin enhances expression of HSP 47 and collagen-1 in human lung fibroblasts // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 20. – 17367817.

Рецензенты:

- Бишарова Г.И. д.м.н., профессор, директор Читинского филиала ГУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН», г. Чита;
- Патюк А.В. д.м.н., профессор кафедры СПП и ППО ФГБОУ ВПО «Забайкальский государственный университет», г. Чита.
- Работа получена редакцией 25.06.2012.