

На правах рукописи

МАЛЫШЕВА

Евгения Михайловна

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ И ЕЕ МОДИФИКАЦИЯ
ПРИ РАДИОИНДУЦИРОВАННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ЛЕГКИХ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Тюмень, 2021

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России и ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Кириллов Юрий Александрович

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Розенберг Олег Александрович

Официальные оппоненты:

Сазонов Сергей Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

Шевлюк Николай Николаевич - доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Защита диссертации состоится «__» «_____» 2021 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д 208.101.02 при ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 625023, г. Тюмень, ул. Одесская, 54.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России по адресу: 625023, г. Тюмень, ул. Одесская, д. 54 и на сайте www.tyumsmu.ru.

Автореферат диссертации разослан «__» «_____» 2021 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
Д 208.101.02, доктор медицинских наук,
профессор

Вихарева Лариса Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Болезни органов дыхания традиционно занимают одно из ведущих мест в структуре наиболее распространенных заболеваний человека. С годами эта тенденция еще более упрочилась за счет увеличения частоты и распространенности не только обструктивных, но интерстициальных заболеваний легких (ИЗЛ) (Т. Alfaro et al., 2019, D. Mannino, 2019). В наступившем столетии в качестве определяющих, лежащих в основе классификации ИЗЛ, были учтены следующие факторы: этиология (известная или неизвестная), характер воспаления (диффузное или гранулематозное), значение в патогенезе иммунных механизмов. Классификация ИЗЛ, разработанная на основе рекомендаций Американского торакального общества и Европейского респираторного общества как раз и учитывает эти критерии (W. Travis et al., 2013). Вместе с тем, сходные изменения в легких, завершающиеся в значительном числе случаев фиброзированием легочной ткани, возникают также при воздействии на нее и токсических лекарственных препаратов химических веществ и радиоиндуцированном повреждении легких (РИПЛ). Появившиеся в последние годы сведения о ведущей роли оксидативного стресса (ОС) и эндотелиальной дисфункции (ЭД) в развитии некоторых заболеваний органов дыхания (Н.М. де Сильва и соавт., 2015) и респираторно-кардиальной коморбидной патологии (А.Х. Ахминеева, 2015), указывают на их причастность к морфогенезу РИПЛ. В связи с тем, что в настоящее время лучевое воздействие, применяемое для лечения опухолей грудной и внутригрудной локализаций, включено в стандарты оказания медицинской помощи пациентам, изучение ОС и морфологических особенностей ЭД и возможностей её модификации с целью минимизации последствий воздействия ионизирующего излучения является актуальным научным направлением.

Степень разработанности темы исследования

Достаточно изученными можно считать только заключительные фазы РИПЛ, установленные на основании клинических наблюдений и немногочисленных экспериментальных данных. В настоящее время очень мало известно о начальных этапах морфогенеза РИПЛ, т.е. о том периоде, когда возможности саногенеза еще не исчерпаны, и процесс не принял характер необратимо нарастающего повреждения легких (J. Fellrath et al., 2003, K. Ahmad et al., 2017). Предположения о наличии или отсутствии ОС и ЭД базируются, как правило, лишь на клинико-лабораторных данных и не имеют морфологического подтверждения. Для коррекции начальной стадии РИПЛ радиационного пневмонита, для которого характерными являются проявления интерстициального отека разной степени выраженности и альвеолита, традиционно используют фармакологические средства, обладающие антиэкссудативной активностью и способностью подавлять иммунологические реакции. Всем этим требованиям в полной мере отвечают глюкокортикоиды, обладающие не только противовоспалительным, но и иммуносупрессивным эффектами (С.Н. Авдеев и соавт., 2019). Считается, что в ранние стадии радиационного поражения легких терапия глюкокортикостероидами не имеет разумной альтернативы. В то же время существует насущная необходимость использования в этот период медикаментов, обладающих не только противовоспалительными и иммуносупрессивными эффектами, но и реализующих антиоксидантное, радиопротективное и антифибротическое действие.

Цель исследования: установить морфологические особенности эндотелиальной дисфункции при экспериментальном радиоиндуцированном повреждении лёгких, оценить влияние препарата Сурфактант-БЛ на её модификацию.

Задачи исследования:

1. Изучить в эксперименте морфогенез РИПЛ, вызванного однократным локальным облучением. Оценить роль и значение ОС и ЭД в его инициации.
2. Диагностировать при помощи морфологических методов ЭД, возникающую при экспериментальном РИПЛ и возможности ее модификации препаратом Сурфактант-БЛ.
3. Определить значение и возможность раман-спектроскопического исследования для диагностики и оценки выраженности ОС и ЭД, возникающих при заболеваниях органов дыхания на примере экспериментального РИПЛ.

Научная новизна

Данная работа впервые убедительно показала, что важнейшим моментом в развитии РИПЛ играет раннее формирование ЭД, реализующейся, прежде всего, на уровне сосудистой, преимущественно капиллярной, составляющей легочной ткани. Для идентификации ЭД был впервые использован комплекс тонких чувствительных прецизионных морфологических методов, таких как иммуногистохимический (ИГХ), электронномикроскопический, а также биофизический метод рамановской спектроскопии, сочетающий флуоресценцию и спектроскопию комбинационного рассеяния и успешно зарекомендовавший себя для диагностики опухолей мочеполовой системы, воспалительных заболеваний малого таза у женщин и зубочелюстной патологии.

Раскрытие ведущей роли ЭД и ОС в развитии лучевого повреждения легочной ткани позволило по-новому оценить существующие представления о морфогенезе лучевых пневмонитов. Впервые на ультраструктурном уровне и спектроскопически были выявлены сопряженные взаимоотношения между ЭД и ОС, реализующимися, прежде всего, в самые ранние сроки после лучевого воздействия в составляющих аэрогематического барьера, и персистенцию ЭД на фоне минимизации проявлений ОС.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты имеют важное теоретическое значение для пульмонологии, патологической анатомии, онкологии, профессиональной патологии, поскольку расширяют представление о морфогенезе РИПЛ, что может быть использовано при проведении экспериментальных исследований, а также диагностических и лечебных мероприятий. Результаты исследования вносят существенный вклад в расширение и дополнение фундаментальных сведений и существующих теоретических представлений о закономерностях возникновения и развития ИЗЛ. В работе приведены данные о ведущей роли ОС и ЭД в инициации повреждения легочной ткани и последующем развитии воспалительного процесса. В результате проведенного научного исследования на экспериментальной модели РИПЛ доказана необходимость и эффективность использования в начальную стадию РИПЛ препаратов комплексного действия, обладающих не только противовоспалительными, но и антиоксидантными и радиопротективными эффектами. Установлено, что отечественный препарат Сурфактант-БЛ, разрешенный для медицинского применения при респираторном дистресс-синдроме и некоторых формах туберкулеза, обладает пульмоно- и эндотелиопротективными свойствами. В отличие от проведенных ранее исследований, в т.ч. и экспериментальных, показавших, что применение сурфактанта приводит к ослаблению распространенности повреждения и увеличению объема функционирующей ткани легкого, было доказано, что эти эффекты обусловлены не только восполнением дефицита сурфактанта, имеющем место при РИПЛ, но и модулирующим действием сурфактанта на морфогенез развивающихся при действии ионизирующего излучения ЭД и ОС. Полученные данные могут быть положены в основу принятия решения о расширении показаний для медицинского применения препарата Сурфактант-БЛ.

Методология и методы исследования

Для достижения цели и выполнения конкретных задач, определенных в качестве таковых в настоящем исследовании была применена совершенно

новая методология, представляющая собой совокупность методов, используемых в различных отраслях науки и дающих возможность в данном конкретном случае идентифицировать и выяснить существо ОС и ЭД. Наряду с рутинными общепринятыми и общеупотребимыми (макроскопическое описание, гистологическое изучение) были применены тонкие прецизионные морфологические (ИГХ, электронномикроскопический) методы. Был также использован биофизический метод рамановской спектроскопии, сочетающий в себе флуоресценцию и спектроскопию комбинационного рассеяния позволяющий выявить как молекулы химических неорганических (свободные радикалы), так и органических (флавинадениндинуклеотид, гемоглобин) соединений.

Положения, выносимые на защиту

1. Иницирующими факторами экспериментального радиоиндуцированного повреждения легких являются ОС и сопряженная с ним ЭД, возникновение и прогрессирование которых обусловлено повреждением капилляров альвеолярных септ.

2. ЭД при РИПЛ реализуется преимущественно на уровне капиллярной составляющей сосудистой сети легкого и играет существенную роль в изменении его ангиоархитектоники, проявляющейся как редукцией капиллярной сети, так и ангиогенезом.

3. Сурфактант-БЛ, применяемый интратрахеально в ранние сроки эксперимента, приводит к модификации ЭД, что проявляется уменьшением распространенности и тяжести повреждения сосудов и легочной паренхимы и превалированием ангиогенеза над редукцией капиллярной сети.

Личный вклад автора

Автор принял непосредственное участие в выборе темы работы, формулировке цели, задач и разработке методологии исследования. Автор лично определил оптимальный набор необходимых методов исследования, в ходе работы осуществил забор материала, провел гистологическое, ИГХ и электронномикроскопическое исследования. Автор принял деятельное

участие в проведении раман-спектроскопического изучения исследуемого материала, а также анализе, научной интерпретации и статистической обработке полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Работа соответствует формуле научной специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология в части «... функционирования клеток и тканей, их взаимодействия как в норме, так и при различных патологических нарушениях»; области исследования согласно пунктам – 5, 6, 7; отрасль «медицинские науки».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается использованием значительного и адекватного количества научных источников по теме диссертации; применением большого набора морфологических методов, включая прецизионные ИГХ и электронномикроскопические исследования, проведением раман-спектроскопического и флуоресцентного изучения образцов легочной ткани; реализацией оригинальной методики экспериментального моделирования РИПЛ; использованием с целью модификации эндотелиальной дисфункции разрешенного для медицинского применения препарата Сурфактанта-БЛ, доказавшего свою эффективность при лечении иных проявлений легочной патологии; проверки достоверности путем сравнения теоретических и экспериментальных результатов, а также положительным результатом практической реализации разработанных теоретических положений. Достоверность результатов также подтверждается значительным объемом опытов и достаточным количеством исследованных лабораторных животных, адекватностью применённых методик, в том числе методов статистической обработки результатов исследований, качеством использованного оборудования и его сертификацией.

Апробация результатов исследования

Основные результаты доложены и обсуждены на юбилейной научно-практической конференции, посвященной 120-летию со дня основания 40

городской клинической больницы «Многопрофильная больница современного города: вчера, сегодня, завтра» (Москва, 2018); научно-практической конференции «Актуальные вопросы патологической анатомии» (Тюмень, 2018); научной конференции с международным участием, посвященной 170-летию кафедры патологической анатомии имени академика А.И.Струкова (Москва, 2019); XXXI Европейском конгрессе патологов (Ницца, 2019).

Внедрение результатов

Результаты исследования используются в учебном процессе, проводимом со студентами лечебного и педиатрического факультетов, на кафедрах гистологии и патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования опубликовано 9 работ, в том числе 5 статей в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 119 страницах, состоит из введения, 3 глав с изложением состояния и степени разработанности темы исследования на основании анализа современной литературы, использованных методик исследования, основных результатов проведенной работы, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 128 источников, в том числе 45 отечественных и 83 иностранных. Работа иллюстрирована 34 рисунками и 1 таблицей.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Для выполнения задач, поставленных в настоящем исследовании, было использовано 158 белых нелинейных половозрелых крыс-самцов массой тела 180,0 – 200,0 г. РИПЛ моделировали на животных, используя рентгено-

диагностический комплекс РУМ–17 (напряжение 200 кВ, сила тока 15 мА, фильтры 0,5 мм Cu+ 1,0 мм Al, кожно-фокусное расстояние 25 см, мощность дозы 32 мГр/с, коэффициент неравномерности распределения дозы по горизонтали - не более 1,03, колебание мощности дозы не превышало 15%).

Животных выводили из опыта внутрибрюшинным введением нембутала в дозе 80 мг/кг. Контрольную группу составили 20 животных. Эвтаназия проводилась в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях.

Морфогенез РИПЛ, вызванного однократным локальным облучением. Значение ОС и ЭД в его инициации

Спустя одни сутки макроскопически лёгкие выглядели неизмененными, однородного светло-розового цвета, умеренной воздушности, плевра гладкая, влажно-блестящая. При изучении на светооптическом уровне гистологических препаратов и полутонких образцов не было выявлено сколько-нибудь существенных свидетельств повреждающего воздействия ионизирующего излучения на легочную ткань. Воздухопроводящие пути и паренхима лёгкого выглядели неповрежденными, сохраняли нормальную воздушность, отдельные кровеносные сосуды были умеренно полнокровны. При электронномикроскопическом исследовании просвет капилляров в образцах, полученных из субплевральных участков, выглядел суженным за счет набухания эндотелия. Цитоплазма эндотелиальных клеток была электронно-прозрачной и практически лишена органелл, местами формировала горбообразные выпячивания, элементы цитоскелета не определялись. В интрапульмонарных участках эндотелий был также утолщен, однако цитоплазма отдельных клеток содержала некоторое количество пиноцитозных пузырьков и вакуолей от единичных до заполняющих её практически полностью. Альвеолоциты второго типа, в целом, не имели особенностей и характерных черт по сравнению с нормой, убедительно свидетельствовавших об их повреждении за исключением осмиофильных

пластинчатых телец, в которых наблюдали нарушение упорядоченного расположения мембран. Экспрессия маркеров эндотелиальной функции и суммарное содержание фосфолипидов (ФЛ) сурфактанта не отличались от таковых в контрольной группе. Через трое суток после лучевого воздействия макроскопически лёгкие приобретали незначительную пестроту за счет появления участков неравномерного кровенаполнения и мелких кровоизлияний, расположенных субплеврально. Межалвеолярные перегородки выглядели утолщенными, в основном, за счёт прогрессирующего отёка интерстиция и очаговой или местами диффузной инфильтрации лимфоцитами, макрофагами и единичными эозинофильными лейкоцитами. На ультраструктурном уровне изменения капилляров, выявленные ранее, не только сохранялись, но и имели тенденцию к прогрессированию. Прежде всего, это касалось полнокровия капилляров, которое приобрело уже распространенный характер. В набухших эндотелиальных клетках органеллы полностью или частично отсутствовали. В участках эндотелиоцитов, прилежащих к базальной мембране, обнаруживали участки просветления. Эти изменения сочетались с увеличением электронной плотности плазмы крови. Экспрессия всех маркеров эндотелиальной функции была значительно снижена по сравнению с предыдущим сроком и контрольной группой, раман-спектроскопическое исследование выявило повышенное содержание свободных радикалов и гидроксильных групп в исследуемых образцах (рисунок 1), суммарное содержание ФЛ достигло своего минимума (рисунок 2).

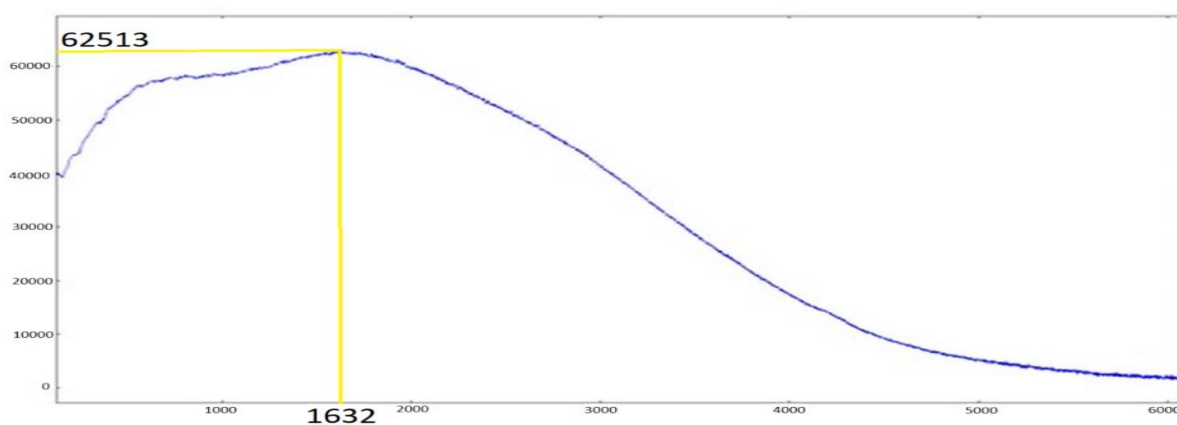


Рисунок 1. Радиоиндуцированное повреждение легких, 3 сутки. Раман-флуоресцентный спектр легочной ткани. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией и соответствует флуоресценции гидроксильных и метильных радикалов. На оси абсцисс – значения рамановского сдвига (относительные сантиметры); на оси ординат – значения интенсивности флуоресценции (относительные единицы флуоресценции)

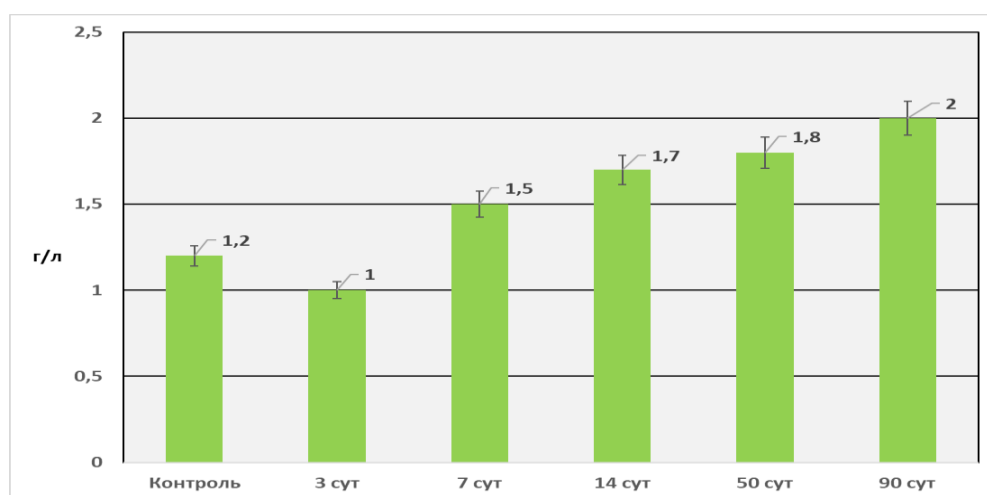


Рисунок 2. Радиоиндуцированное повреждение легких, 3 сутки – динамика содержания фосфолипидов сурфактанта в легком экспериментального животного

Через неделю (7 сутки) выраженные расстройства кровообращения (серозно-геморрагический люминарный отек, полнокровие капилляров и диапедез эритроцитов) идентифицировали уже на светооптическом уровне. Конец первой недели эксперимента был также отмечен появлениям первых ателектазов, расположенных исключительно субплеврально. Показатели экспрессии маркеров ЭД оставались на низком уровне, концентрация

свободных радикалов была, по-прежнему, высокой. Биохимическое исследование ФЛ сурфактанта выявило прогрессирующее снижение практически всех его фракций, суммарное содержание ФЛ оставалось сниженным. Интервал между 7 и 14 сутками стал в известной степени критическим для проводимого эксперимента. Он характеризовался прогрессированием вышеописанных признаков и «продвижением» лучевых альтераций вглубь легкого, в дистальном по отношению к плевре направлении. Кроме того, этот период ознаменовался увеличением частоты появления ателектазов, как тотальных, так и в сочетании с дистелектазами, причем в той же последовательности идентификации альтераций. Наряду с субплевральными, были обнаружены ателектазы, локализующиеся интрапульмонарно. По сравнению с субплевральными они были значительно меньше по площади, но гораздо более распространенными и характеризовались мозаичностью расположения. При электронно-микроскопическом исследовании образцов было выявлено прогрессирование альвеолярно-капиллярного блока и приобретение последним качественных особенностей. Интенсивность экспрессии маркеров эндотелиальной функции достигла своего минимума, а по некоторым показателям (CD31, CD117, VEGF1, VEGF2) вовсе отсутствовала (таблица 1).

Таблица 1 - Оценка ИГХ реакции с антителами к CD31, CD34 и e-NOS

Показатели	Контрольная группа	Сроки наблюдения, сут.									
		3		7		14		50		90	
		R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
CD31	++	+	+	-	+	-	+	+	++	+	+++
CD34	+	-	-	-	+	-	++	+	++	+	++
e-NOS	+	+	++	-	++	-	++	+	+++	+	+++

Примечание: R – радиоиндуцированное воздействие, S – ингаляция препарата легочного сурфактанта после завершения облучения; оценка ИГХ реакции с антителами к CD31, CD34 и e-NOS: - – реакция отсутствует; + – слабая реакция; ++ – умеренная реакция; +++ – выраженная реакция.

Содержание маркеров оксидативного состояния, обнаруженное при спектроскопическом исследовании, напротив, было максимальным. В этот период впервые с начала эксперимента суммарное содержание ФЛ сурфактанта начало увеличиваться. Особенности изменений легочной ткани, отмеченными спустя 50 суток после начала эксперимента, было сочетание диффузных изменений в виде утолщения стенок альвеол за счет очаговой, а местами диффузной клеточной инфильтрации и разрастания соединительной ткани, и очаговых изменений, возникших, благодаря реализовавшимся ателектазам. Ангиоархитектоника легкого также приобрела новые качественные характеристики. Просветы капилляров повсеместно выглядели расширенными, деформированными и приобретали вид причудливых сосудистых полостей «каверн». В участках реализовавшихся ателектазов состояние сосудистой внутриорганной сети проявлялось выраженной редукцией капиллярного русла. Суммарное содержание ФЛ по сравнению с периодом стихания ОС (14 сутки) и показателями контрольной группы было повышено, однако анализ фракционного состава ФЛ выявил увеличение фракции фосфатидилхолина и сохранение более низких по сравнению с контрольной группой значений фосфатидилэтаноламина и продолжающееся снижение показателей фосфатидилглицерина и кардиолипина. Экспрессия маркеров эндотелиальной функции проявлялась по-разному в участках склероза и сохранившейся легочной ткани. В участках предсуществующих ателектазов наблюдали содержание CD34, VEGFR2 и e-NOS, в зонах повышенной воздушности, особенно в участках бронхиоло-альвеолярных и альвеолярно-альвеолярных переходов и контактов – CD117. В заключительный период эксперимента (90 суток) в легочной ткани наблюдали, сочетание очаговых склеротических изменений в виде полей склероза на месте предсуществующих ателектазов и диффузных изменений в виде утолщения межалвеолярных перегородок за счет соединительнотканной трансформации. В участках склероза наблюдали признаки ангиогенеза и экспрессию VEGFR1, VEGFR2, CD34. При рамановской спектроскопии

выявлены качественно новые особенности спектров. Их форма имела вид параболы с несколькими выраженными локальными максимумами и зоной пониженной флуоресценции между ними (рисунок 3).

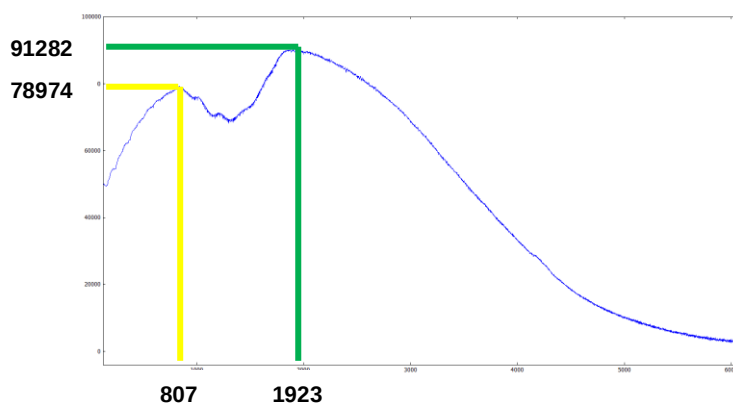


Рисунок 3. Радиоиндуцированное повреждение легких, 90 сутки. Раман-флуоресцентный спектр легочной ткани. Локальные максимумы флуоресценции обозначены цветными вертикальными линиями и соответствуют флуоресценции флавинадениндуклеотида – первый (желтый цвет) и гемоглобина – второй (зеленый цвет). На оси абсцисс – значения рамановского сдвига (относительные сантиметры); на оси ординат – значения интенсивности флуоресценции (относительные единицы флуоресценции)

По сравнению с началом эксперимента спектры имели отличия еще и по значениям инициальной и остаточной флуоресценции. В результате однократного локального облучения средней и прилежащих к ней участков верхней и нижней долей правого легкого в дозе 12 Гр возникает РИПЛ, вследствие развития в ней ОС, подтвержденного раман-спектроскопическим исследованием, а также сопряженной с ним ЭД.

Таким образом, изучение спектров образцов легочной ткани животных, подвергшихся лучевому воздействию, и контрольной группы позволило идентифицировать ОС и установить его продолжительность. Спектры экспериментальных животных отличались повышенными показателями всех видов флуоресценции, а также наличием локальных максимумов флуоресценции, обусловленных повышенным содержанием в ткани легкого свободных супероксидов кислорода, гидроксильных и метильных радикалов. Воздействие активных форм кислорода и реализацию кислородного эффекта мы наблюдали в облученной доле, начиная с первых суток эксперимента,

персистенцию ОС в течение семи суток и его завершение к 50 суткам опыта. Нарушение эндотелиальной функции мы доказали с помощью ИГХ исследования, выявив при помощи соответствующих антител маркеры, экспрессия которых является исключительной прерогативой эндотелиоцитов (VEGFR1, VEGFR2) и уменьшается в результате лучевого воздействия. Кроме того, были использованы антитела по выявлению мембранных белков, молекул клеточной адгезии, оказывающих модулирующее или корректирующее влияние на ангиогенез (CD31, CD34) или васкулогенез (CD117) и, наконец, выявили динамику экспрессии эндотелиальной синтазы азота (e-NOS), ключевого фермента-катализатора реакции синтеза оксида азота из аргинина, кислорода и NADPH, также ингибируемых ОС (таблица 2).

Таблица 2 - Оценка иммуногистохимической реакции с антителами к CD117, VEGFR1 и VEGFR2 (количество позитивно окрашенных клеток в 1 поле зрения, x200)

Группа	Сроки наблюдения, сут.	n	CD117	VEGFR1	VEGFR2
Контрольная		50	1,0±0,1	8,6±0,9	240,1±22,9
R	3	50	0,6±0,1*	6,2±0,8*	180,2±19,8
	7	50	0,8±0,1	7,4±0,9	250,6±26,4
	14	50	1,5±0,2*	11,6±1,3	310,5±32,7
	50	50	0,8±0,1	17,2±1,8§	530,7±60,4§
	90	50	1,0±0,1	20,2±1,9§	840,2±90,2§
S	3	50	2,6±0,3§	12,8±1,2†	270,3±25,1
	7	50	5,8±0,7§	18,6±2,0§	420,4±44,1§
	14	50	6,2±0,8§	24,8±2,6§	800,3±79,2§
	50	50	9,6±1,0§	48,6±5,1§	1260,9±105,3§
	90	50	10,2±1,1§	51,6±5,3§	1340,5±110,7§

Примечание: n – число полей зрения, R – радиоиндуцированное воздействие, S – ингаляция препарата легочного сурфактанта после завершения облучения, * – $p<0,05$, † – $p<0,01$, § – $p<0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Модификация эндотелиальной дисфункции препаратом сурфактант-БЛ при экспериментальном РИПЛ

Препарат Сурфактант-БЛ, введенный интратрахеально, через сутки после облучения был идентифицирован в просвете терминальных бронхиол и альвеол. Начиная с третьих суток эксперимента, т.е. после троекратных ингаляций препарата, влияние сурфактанта на легочную ткань проявилось в виде изменений раман-флуоресцентного спектра. При сохранении параболической формы кривой показателя инициальной, суммарной и остаточной флуоресценции были существенно ниже данных, зарегистрированных в эти сроки в группе нелеченых животных. Значения локального максимума флуоресценции также имели отличия, как по интенсивности флуоресценции, так и по частоте рамановского сдвига. Несмотря на то, что локальный максимум флуоресценции по-прежнему был обусловлен наличием гидроксильных, метильных и супероксиданионрадикалов снижение показателей флуоресценции свидетельствовало об уменьшении концентрации активных форм кислорода в легочной ткани. При ИГХ реакции на фоне применения сурфактанта показатели экспрессии CD117, VEGFR1 и VEGFR2 не только не уменьшились, но были несколько выше значений контрольной группы. В группе CD31, CD34 e-NOS результаты ИГХ реакции были несколько скромнее и, в целом, соответствовали данным контрольной и опытной групп за исключением показателя CD34, экспрессия которого не определялась, как и в группе нелеченых животных. Анализ спектральных характеристик образцов легочной ткани на 7 сутки после лучевого воздействия и применения препарата выявил в большинстве случаев нормализацию спектров и их соответствие образцам контрольной группы экспериментальных животных. Результаты ИГХ реакции показали повышение экспрессии CD117, а также VEGFR1 и VEGFR2 по сравнению с предыдущим сроком и превышение значений контрольной группы по маркеру e-NOS. Результат введения сурфактанта на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях стал заметен

спустя 14 суток после лучевого воздействия в виде ослабления распространенности повреждения, что приводило к достоверному ($p < 0,001$) увеличению объема функционирующей ткани легкого по сравнению с показателями нелеченых животных.

Еще более значительным было влияние препарата на капилляры аэрогематического барьера, что проявлялось отсутствием спазма последних, снижением частоты и выраженности повреждения эндотелиальных клеток (дистрофия, внутриклеточный отек, нарушение ультраструктуры) и относительной редкостью тромбоцитарно-эритроцитарных ассоциаций и тромбов. При этом в составляющих аэрогематического барьера были отмечены проявления эндоцитоза: рецептор-опосредованного, по-видимому, в альвеолоцитах первого типа и пиноцитоза в эндотелиоцитах. Уровень экспрессии маркеров эндотелиальной функции к 14 суткам после введения облученным животным сурфактанта, минимальный или вовсе неидентифицируемый у нелеченых животных, намного превышал показатели контрольной группы. Спектры некоторых образцов легочной ткани приобретали вид двугорбой параболы. Через 50 суток после облучения и ингаляций препарата участки легких, в которых выявили очаговые расстройства кровообращения, занимали не более 20% ткани. Еще реже, по сравнению с облученным контролем, они сопровождались стазами и диапедезными кровоизлияниями. Нарастали и структурные изменения в эндотелиоцитах, свидетельствовавшие о нормализации эндотелиальной функции и проницаемости стенок капилляров. В легком ингалировавших сурфактант животных среди эндотелиоцитов встречали как элементы с электронноплотной цитоплазмой, так и светлые клетки с умеренно набухшими митохондриями и небольшим количеством микропиноцитозных пузырьков. Уровень экспрессии маркеров эндотелиальной функции к 50 суткам после введения облученным животным сурфактанта, значительно превышал показатели, наблюдаемые как у нелеченых животных, так и у контрольной группы. Значения экспрессии CD31 в этот период эксперимента

соответствовали таковым в группе контроля и превысили их лишь к завершению эксперимента (90 суток). Спустя 90 суток после воздействия радиации на фоне применения сурфактанта наблюдали участки расширения межалвеолярных перегородок с уменьшением просвета альвеол вплоть до образования щелевидных пространств. Чаше расширение альвеолярных септ было обусловлено полнокровием капилляров, и клеточной инфильтрацией. Спектры образцов легочной ткани имели формы двугорбой параболы с участком пониженной флуоресценции между ними и двумя локальными максимумами флуоресценции, обусловленными флавинадениндинуклеотидом и гемоглобином. Таким образом, трёхкратное введение Сурфактанта-БЛ оказало благотворное влияние на состояние легочной ткани, и в проведенном нами исследовании удалось выявить следующее. В группе животных, ингалировавших препарат, значительно раньше, чем в нелеченой группе, отметили изменение спектральных характеристик уже на 14 сутки и появление двугорбого спектра. Это, по нашему мнению, свидетельствовало об ослаблении проявлений ОС, поскольку свободные гидроксильные, супероксидные и метильные радикалы уже не были выявлены на спектре, а их место на авансцене было заполнено флавинадениндинуклеотидом. Кроме того, идентификация на спектрах гемоглобина, начиная опять-таки с 14 суток, была расценена нами в качестве показателя нормализации эндотелиальной функции и инициации ангиогенеза. К аналогичному выводу мы пришли, анализируя результаты ИГХ реакции, которые стабилизировались к 14 суткам, далее приобрели устойчивую тенденцию к повышению и достигли своего апогея к завершению эксперимента.

Заключение

В результате проведенного нами экспериментального исследования установлено, что при однократном локальном воздействии ионизирующего излучения возникают повреждения в структуре всех компонентов альвеолярной стенки, характер и последовательность развития которых

соответствуют морфологической картине радиационного пневмонита (альвеолита). Во всех случаях имеют место, во-первых, начальные (инициальные) проявления в виде повреждения эндотелиоцитов капилляров и их базальной мембраны, сурфактантного альвеолярного комплекса, альвеолоцитов I и II типов, составляющих компонентов и структур интерстиция: клеток, коллагеновых и эластических волокон и основного вещества межклеточного матрикса. Эти изменения развиваются на фоне выраженных расстройств кровообращения в виде расширения и полнокровия капилляров межалвеолярных перегородок и венул, прогрессирующего внутриклеточного, интраальвеолярного отека и отека интерстициального пространства. Расстройствам кровообращения корреспондирует значительное и прогрессирующее снижение ФЛ сурфактанта, достигавшее своего минимума к 3 суткам после начала опыта. После непродолжительного критического периода наблюдали развитие очагового и диффузного воспалительного процесса, обязательной составляющей которого явилось возникновение и прогрессирование сосудисто-паренхиматозного (альвеолярно-капиллярного) блока и склероза. В нашем наблюдении деструктивное, по сути прооксидантное, острие лучевого воздействия оказалось направленным в первую очередь на компоненты альвеолярной стенки. Для оценки ОС в данной работе мы впервые использовали комбинированный метод рамановской спектроскопии, сочетающий в себе по существу две хотя и родственных, но отличающихся по физической сути технологии: флуоресценции и спектроскопии комбинационного рассеяния, что позволило расширить его диагностические возможности. Поскольку частоты колебаний определяются характером внутри- и межмолекулярных связей, то спектр каждого химического соединения является уникальным и зависит от его аллотропной формы и агрегатного состояния. При анализе регистрируемых с образца легочной ткани результатов мы учитывали общий вид и особенности раман-флуоресцентного спектра, показатели начальной (инициальной), суммарной и остаточной (резидуальной) флуоресценции, выражающиеся в относительных

единицах, локальных максимумов флуоресценции и наличие или отсутствие специфических «рамановских» пиков, соответствующих колебаниям молекул различных веществ. Учитывали также значение рамановского сдвига, регистрируемого на оси абсцисс. В результате проведенного исследования было установлено, что действие ОС обнаруживается уже в первые сутки, достигает своего пика к третьим и постепенно сходит на нет к 50 суткам эксперимента. Локальный максимум флуоресценции в эти сроки обусловлен повышенным содержанием в тканях гидроксильных радикалов $-\text{OH}$, супероксиданионрадикалов O_2^- и некоторого количества метильных радикалов $-\text{CH}_3$ -. Метильные радикалы в условиях ОС могут вступать в реакцию с кислородом с образованием формальдегида, обладающего выраженными гидрофильными свойствами. Данное исследование по-новому раскрывает роль супероксиданионрадикала O_2^- в прогрессировании ОС. Если в нормальных физиологических условиях супероксидный радикал в небольших концентрациях постоянно образуется в клетках и инактивируется системой опять-таки естественных антиоксидантов, то при РИПЛ не исключается его синтез ферментативным путем под действием NO-синтазы. Это обстоятельство объясняет часто имеющий место при РИПЛ дефицит оксида азота, ключевого показателя эндотелиальной функции, поскольку значительная часть NO-синтазы, используемая для синтеза оксида азота из аргинина, реализуется на образование супероксидного радикала. Кроме того, супероксиданион радикал способен и самостоятельно снижать уровень оксида азота, превращая его в пероксинитрит (ONOOH). Эти моменты, как представляется, являются ключевыми для инициации ЭД при РИПЛ, а супероксидный радикал является фактором, опосредующим и регулирующим степень и выраженность развития ЭД. В дальнейшем именно ЭД является модератором реализации, как инициальных проявлений лучевого повреждения, так и последовательного развития в динамике интерстициального воспаления, гранулематозного воспаления и фиброза. В данном исследовании нами был предпринят несколько иной путь для

установления ЭД с использованием ИГХ исследования, метода рамановской спектроскопии, подкрепленных морфологическим исследованием легочной ткани, в том числе на ультраструктурном уровне. ИГХ исследование срезов для идентификации эндотелиальных клеток, циркулирующих эндотелиальных клеток и предшественников эндотелиальных клеток с целью характеристики эндотелиальной функции проводили с применением антител к CD31, CD34, CD117, VEGFR1, VEGFR2 и эндотелиальной синтазе оксида азота (e-NOS). Раман-спектроскопическое исследование образцов легочной ткани в различные сроки эксперимента не только убедительно показало и оценило наличие и степень выраженности оксидативного стресса, но и оказалось впоследствии чрезвычайно полезным для оценки нормализации эндотелиальной функции.

ВЫВОДЫ

1. Однократное локальное облучение средней и прилежащих к ней участков верхней и нижней долей правого легкого в дозе 12 Гр приводит к возникновению в них радиоиндуцированного повреждения обусловленного развитием оксидативного стресса и сопряженной с ним эндотелиальной дисфункцией.
2. Инициальным проявлением повреждения легочной паренхимы являются диффузные изменения, наиболее выраженные в капиллярном компоненте аэро-гематического барьера.
3. Маркерами оксидативного стресса, реализующегося в легких экспериментальных животных при облучении, являются повышенные показатели всех видов флуоресценции, а также локальные максимумы флуоресценции, обусловленные избыточным содержанием в ткани легкого свободных супероксидов кислорода, гидроксильных и метильных радикалов.
4. Морфологическими проявлениями эндотелиальной дисфункции, сопряженной с оксидативным стрессом, являются повреждение эндотелиоцитов капилляров, расстройства кровообращения и угнетение показателей эндотелиальной функции, выявляемых иммуногистохимически.

5 Интратрахеальное введение сурфактанта приводит к модификации оксидативного стресса, что проявляется уменьшением его продолжительности (14 сутки) и снижением показателей флуоресценции и локальных максимумов, обусловленных свободными радикалами.

6 Показатели модификации эндотелиальной дисфункции препаратом Сурфактант-БЛ подразделяются на спектроскопические (идентифицируемое повышение концентрации гемоглобина в тканях) и иммуногистохимические (нормализация показателей эндотелиальной функции).

7 Препарат Сурфактант-БЛ, содержащий фосфолипиды, реализует антиоксидантный эффект, инактивируя свободные радикалы и нивелируя оксидативный стресс, поэтому целесообразно вводить препарат не до, а после лучевого воздействия на фоне реализовавшегося оксидативного повреждения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Фиброзирующий альвеолит и рак лёгкого при прогрессирующем системном склерозе / И.А. Чернов, **Е.М. Малышева**, Н.В. Жарков, Е.А. Старцева, С.Е. Тимофеев, Ю.А. Кириллов // **Медицинская наука и образование Урала.** – 2019. – № 1 (97) – С. 71-74.

2. Лёгочный фиброз как проявление системной патологии соединительной ткани / И.А. Чернов, **Е.М. Малышева**, С.Е. Тимофеев, Е.А. Старцева, Н.В. Жарков, Ю.А. Кириллов // **Медицинская наука и образование Урала.** – 2019. - – №2 (98). – С. 66-69.

3. Чернов И.А., Кириллов Ю.А., **Малышева Е.М.** Использование литературно-художественных образов в преподавании патологической анатомии // Университетская медицина Урала. – 2019. – №3 (18). – С. 57-58.

4. **Малышева Е.М.**, Старцева Е.А., Жарков Н.В. Легочные проявления системной патологии соединительной ткани // Материалы научной конференции с международным участием, посвященной 170-летию кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова ФГАОУ

ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Москва, 2019). – С. 42-43.

5. Морфологическая характеристика эндотелиальной дисфункции при радиоиндуцированной патологии легких в эксперименте и её модификация препаратом легочного сурфактанта / Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, **Е.М. Малышева**, С.Е. Тимофеев, Н.В. Жарков, А.А. Сейлиев, О.А. Розенберг // **Медицинская наука и образование Урала**. – 2019. – №4 (100). – С. 46-53.

6. Raman-fluorescent characteristics of bleomycin-induced pulmonary fibrosis / I. Chernov, **E. Malysheva**, S. Timofeev, V. Kukushkin, Y. Kirillov // *Virchows Archiv*. – 2019. – Vol. 475 (Suppl. 1). – P. 147.

7. Pulmonary fibrosis as a manifestation of connective tissue disease / **E. Malysheva**, S. Timofeev, E. Startseva, N. Zharkov // *Virchows Archiv*. – 2019. – Vol. 475 (Suppl. 1). – P. 238.

8. Морфогенез ателектазов легких при экспериментальном радиоиндуцированном воздействии / Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, **Е.М. Малышева**, С.Е. Тимофеев, Е.А. Старцева, О.А. Розенберг // **Клиническая и экспериментальная морфология**. – 2020. – Т. 9, № 1. – С. 30-39.

9. Оксидативный стресс и эндотелиальная дисфункция в развитии экспериментального радиоиндуцированного повреждения легких и их коррекция препаратом легочного сурфактанта / Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, **Е.М. Малышева**, С.Е. Тимофеев, В.И. Кукушкин, Н.В. Жарков, О.А. Розенберг // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2020. – № 9(1). – С. 35-42.