

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

## **Ферменты азурофильных гранул нейтрофилов и матриксная металлопротеиназа-2 как маркеры стадий развития экспериментального респираторного дистресс-синдрома**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации 672090, Чита, ул. Горького, 39-А

На нелинейных крысах-самцах воспроизводили острый респираторный дистресс-синдром по оригинальной методике. Животным путем пункции трахеи вводили лизат 45-55 тыс. крысиных нейтрофилов в 0,2 мл 0,9% раствора хлорида натрия (способ защищен патентом РФ). В каждую стадию развития синдрома методом ИФА определяли концентрации нейтрофильной эластазы, миелопероксидазы и матриксной металлопротеиназы-2 в плазме крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Показано, что маркером развития экссудативной стадии является увеличение концентраций нейтрофильной эластазы и миелопероксидазы в плазме крови и лаважной жидкости. О пролиферативной стадии свидетельствует высокий уровень матриксной металлопротеиназы-2 при неизменном содержании эластазы и миелопероксидазы в исследованных жидкостях. Уменьшение концентрации матриксной металлопротеиназы-2 в обеих биологических жидкостях сопутствует развитию фибротической фазы дистресс-синдрома.

**Ключевые слова:** стадии экспериментального дистресс-синдрома, эластаза, миелопероксидаза, матриксная металлопротеиназа-2

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

## **Enzymes of azurophilic neutrophil granules and matrix metalloproteinase-2 as markers of the developmental stages of experimental respiratory distress syndrome**

Chita State Medical Academy, 39-A, Gor'kogo str., Chita, 672090

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 syndrome development concentration of neutrophil elastase, myeloperoxidase and matrix metalloproteinase-2 in serum and bronchoalveolar lavage fluid was determined by ELISA. The increase of the concentration of neutrophil elastase and myeloperoxidase in plasma and lavage fluid has been shown to be a marker of exudative stage. Proliferative phase is marked by high levels of matrix metalloproteinase-2 at a constant content of elastase and myeloperoxidase in both liquids. Reduction of matrix metalloproteinase-2 concentration in both biological fluids is accompanied by the development of fibrotic phase distress syndrome.

**Key words:** stages of experimental distress syndrome, elastase, myeloperoxidase, matrix metalloproteinase-2

В настоящее время острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) остается одной из основных проблем медицины, являясь, как и рак легких, наиболее частой причиной смерти в пульмонологии [6, 7]. С 90-х годов XX века выделяют раннюю, трудно диагностируемую обратимую стадию ОРДС — острое повреждение легких (ОПЛ) [2, 5, 7]. Диагноз ОПЛ/ОРДС устанавливают на основании ряда данных: факторов риска, шкалы J. Mugaу (учитывает рентгенографию легких, степень гипоксемии, растяжимость легочной ткани и необходимость особых режимов ИВЛ), отсутствия левопредсердной гипертензии [5-7, 11]. Фазу ОПЛ в

большинстве случаев выделяют, опираясь на индекс артериальной гипоксемии, который является неспецифичным, так как зависит от многих, в том числе внелегочных, причин [1, 3]. Ряд исследователей предлагает диагностировать ОПЛ при помощи оценки содержания внесосудистой воды в легких методом транспульмональной термодилуции [5], который является технически сложным и малодоступным. Кроме того, оценка тяжести и прогноз возможны при уже развившемся ОПЛ, чувствительных и специфичных предикторов развития этого состояния и перехода его в последующую фазу — ОРДС не существует [3, 7, 8].

По данным морфологических исследований легких людей, умерших в результате тяжелой травмы, признаки интерстициального и альвеолярного отека регистрируются уже через 2-3 часа от воздействия повреждающего агента. При этом в сосудах микроциркуляторного русла легких, межальвеолярных перегородках возрастает содержание нейтрофилов и макрофагов, ведущих к их повреждению [7, 8]. В свою очередь, именно с адгезией к эндотелию связан феномен гиперактивации сегментоядерных лейкоцитов, при котором происходит нерегулируемое высвобождение микробцидных соединений не в фагосому, а в экстраклеточное пространство. В этот момент мобилизуются как кислородзависимые бактерицидные системы нейтрофила, так и агрессивные медиаторы азурофильных гранул (эластаза, миелопероксидаза (МРО) и др.) [2]. В свою очередь, эластаза способна активировать семейство матриксных металлопротеиназ (ММП), которые выделяются лейкоцитами, фибробластами в интерстиций в неактивной форме [10, 12] с последующим формированием местного «протеазного взрыва», повреждающего альвеолярно-капиллярную мембрану. В связи с вышесказанным, возникло предположение: уровень аутоагрессивных ферментов нейтрофилов может служить предиктором развития ОПЛ, а их динамика — критерием смены стадий, проверка.

### Методика

Объектом исследования служили половозрелые нелинейные лабораторные крысы-самцы. Эксперименты проводились с соблюдением Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), одобрены локальным этическим комитетом. ОПЛ/ОРДС моделировался следующим образом. Под местной анестезией 0,25% раствором новокаина проводили пункцию трахеи между 3-4 кольцами с одновременным однократным введением лизата 45-55 тыс. крысиных нейтрофилов в 0,15-0,20 мл физиологического раствора. Попадание лизата в бронхиальное дерево контролировали аускультативно: оно косвенно подтверждалось кратковременным замедлением сердцебиения до 180-200 в минуту (при исходном 260-290) и кратковременным апноэ в момент введения.

Для приготовления лизата клетки выделяли из крови животных на ступенчатом градиенте плотности фиколл-верографина: 1,13/1,12/1,06 г/мл. Чистота фракции нейтрофилов составляла 92-94%. Выделенные нейтрофильные гранулоциты разделяли на аликваты по  $50 \pm 5$  тыс. клеток в 0,15-0,20 мл физиологического раствора и путем замораживания-оттаивания из них получали лизаты [9]. Контрольной группе

( $n = 12$ ) эндотрахеально вводили эквивалентные объемы физиологического раствора.

Животных выводили из эксперимента путем передозировки кетамина на 1, 3 и 6 сутки (по  $n = 15$  на каждые). Пробу крови получали пункцией яремной вены, лаваж легких выполняли стерильным 0,9% раствором хлорида натрия. Развитие ОПЛ/ОРДС во всех случаях удостоверяли морфологически, для чего осуществляли забор легких, фиксировали их в нейтральном 10% растворе формалина и заливали в парафин, гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином. Содержание ферментов нейтрофилов в плазме крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) оценивали методом твердофазного ИФА с использованием видоспецифических коммерческих тест-систем фирмы «Antibodies online» (Germany).

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ BIOSTAT. При сравнении групп использовался критерий Краскела-Уоллиса, попарно группы сопоставлялись по критерию Манна-Уитни, различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного (25-й и 75-й перцентили) интервала — указан в скобках.

### Результаты и обсуждение

В первые сутки эксперимента определялась острая (экссудативная) стадия развития синдрома, морфологический эквивалент непосредственно ОПЛ [7], которая характеризовалась проявлениями «острого неинфекционного диффузного десквамативно-макрофагального альвеолита», с накоплением в просвете альвеол мононуклеарных клеток, нейтрофилов и других клеточных элементов, десквамированных альвеолоцитов, отечной жидкости. В просвете сосудов отмечались множественные нейтрофильно-лейкоцитарные стазы, причем не только в капиллярах межальвеолярных перегородок, но и в венах и венулах. Наблюдался выход и накопление эритроцитов в просвете альвеол (рисунок на 3-й странице обложки).

Макроскопически такие легкие были отечны — выполняли практически все свободное пространство грудной клетки, после ее вскрытия не спадались, имели плотнoэластическую консистенцию, темно-красный цвет, с поверхности разрезов стекала отечная жидкость.

В эту стадию развития процесса в плазме крови резко возрастала концентрация всех изучаемых ферментов, но самым значительным был прирост эластазы — почти в 50 раз ( $p = 0,000$ ) (табл. 1).

В БАЛЖ наблюдалась схожая динамика: увеличивалось количество всех энзимов, при этом рост содержания эластазы был пропорционален увеличению

ММР-2 — в два раза по сравнению с контрольными значениями ( $p = 0,002$  и  $p = 0,016$  соответственно) (табл. 2).

На 3 сутки эксперимента в легких микроскопически отмечалось разрешение от отека, регистрировались признаки миграции мононуклеарных клеток и пролиферации фибробластов, а также синтеза коллагена, что является характерным для пролиферативной фазы ОРДС [7]. В эту стадию развития процесса в плазме крови содержание эластазы резко — более чем в 10 раз — уменьшалось, возвращаясь к уровню контрольной группы ( $p = 0,21$ ). Концентрация МРО также снижалась до величин, отмечающихся у здоровых животных ( $p = 0,20$ ). Содержание ММР-2, напротив, оставалось высоким: почти в полтора раза выше, чем у здоровых животных ( $p = 0,003$ ), не отличаясь от уровня предыдущей фазы ОПЛ/ОРДС ( $p = 0,97$ ) (табл. 1). В лаважной жидкости отмечалась аналогичная динамика концентраций изучаемых веществ: количество эластазы и миелопероксидазы

уменьшалось до величин контрольной группы ( $p = 0,09$  и  $p = 0,30$  соответственно), а ММР-2 было по-прежнему высоким, как и в первые сутки эксперимента ( $p = 0,009$  при сопоставлении с контролем и  $p = 0,65$  по сравнению с 1 сутками) (табл. 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 интима артериол в виде гипертрофии мышечного слоя, иногда вплоть до их полной облитерации; появление гиалиновых мембран [7]. В эту фазу и в плазме крови, и БАЛЖ содержание всех изучаемых ферментов было на уровне контрольной группы (табл. 1, 2).

Общепринятым является деление этиологических факторов ОПЛ/ОРДС на две группы: с прямым повреждающим воздействием на легкие (пневмонии, аспирация жидкостей, ингаляция токсикантов и др.) и не оказывающих прямого воздействия на орган (шоки, сепсис и др.). Разработанный нами способ в бо-

Таблица 1  
Концентрация ферментов нейтрофилов в плазме крови на этапах развития экспериментального ОПЛ/ОРДС (Ме (25-й; 75-й))

Фермент	Контроль (n = 12)	1 сутки (n = 15)	3 сутки (n = 15)	6 сутки (n = 15)
Эластаза (нг/мл)	0 (0; 6,0)	45,1 (13,3; 55,8) $p = 0,000^*$	4,2 (0; 19,5) $p = 0,21$ $p_1 = 0,017^*$	0 (0; 6,5) $p = 0,79$ $p_1 = 0,001^*$ $p_2 = 0,30$
ММР-2 (нг/мл)	158,7 (139; 164)	208,6 (191,3; 223,5) $p = 0,001^*$	192,4 (189; 225,2) $p = 0,003^*$ $p_1 = 0,97$	146,3 (130,6; 163,1) $p = 0,19$ $p_1 = 0,000^*$ $p_2 = 0,000^*$
МРО (нг/мл)	68,6 (60,6; 70,4)	92,0 (83,3; 101,5) $p = 0,000^*$	71,2 (66,5; 76,3) $p = 0,20$ $p_1 = 0,003^*$	69,2 (66,5; 73,6) $p = 0,51$ $p_1 = 0,003^*$ $p_2 = 1,0$

Примечание.  $p$  — значение различий по сравнению с контрольной группой;  $p_1$  — значение различий по сравнению с 1 сутками эксперимента;  $p_2$  — значение различий по сравнению с 3 сутками эксперимента; \* — значимые различия.

Таблица 2  
Концентрация ферментов нейтрофилов в БАЛЖ на этапах развития экспериментального ОПЛ/ОРДС — Ме (25-й; 75-й)

Фермент	Контроль (n = 12)	1 сут. (n = 15)	3 сут. (n = 15)	6 сут. (n = 15)
Эластаза (нг/мл)	18,5 (4,2; 33,4)	45,4 (38,5; 54,6) $p = 0,002^*$	26,1 (20; 38,5) $p = 0,09$ $p_1 = 0,024^*$	22,5 (8,9; 36,7) $p = 0,41$ $p_1 = 0,014^*$ $p_2 = 0,76$
ММР-2 (нг/мл)	3,2 (1,1; 5,7)	7,0 (6,2; 7,9) $p = 0,016^*$	7,6 (6,8; 9,9) $p = 0,009^*$ $p_1 = 0,65$	1,9 (0,3; 2,1) $p = 0,18$ $p_1 = 0,000^*$ $p_2 = 0,000^*$
МРО (нг/мл)	74,7 (67,7; 85,4)	90,6 (85,3; 98,5) $p = 0,008^*$	83,8 (80,9; 86,8) $p = 0,30$ $p_1 = 0,03^*$	82,3 (80,6; 87,9) $p = 0,50$ $p_1 = 0,02^*$ $p_2 = 1,0$

Примечание.  $p$  — значение различий по сравнению с контрольной группой;  $p_1$  — значение различий по сравнению с 1 сутками эксперимента;  $p_2$  — значение различий по сравнению с 3 сутками эксперимента; \* — значимые различия.

льшей степени моделирует ОПЛ/ОРДС вследствие прямого воздействия. Возможность воспроизведения синдрома путем введения концентрата медиаторов нейтрофилов, коим является лизат, доказывает их ведущую роль в повреждении альвеолярно-капиллярной мембраны (основного звена патогенеза ОПЛ/ОРДС). Несмотря на наличие определенных особенностей у каждого из этиологических факторов, обязательным триггером синдрома является воздействие системного воспалительного ответа с неконтролируемым распространением в крови провоспалительных цитокинов [2, 7, 8]. Последние вызывают примиривание циркулирующих нейтрофильных гранулоцитов к последующим стимулам, а нейтрофил-опосредованную цитотоксичность считают причиной полиорганных повреждений. Легочная микроциркуляция уникальна: здесь сосредоточен главный пул маргинальных нейтрофилов, и их эмиграция происходит преимущественно из капилляров, поэтому полиморфноядерные лейкоциты являются «виновниками» повреждения легких и в случае развития ОПЛ/ОРДС без непосредственного воздействия на орган.

Адгезия нейтрофилов, респираторный взрыв и секреция азурофильных гранул представляют собой функциональную триаду, объединенную общим механизмом [2], в связи с чем именно в фазу ОПЛ концентрации эластазы и МРО в плазме крови, а также в БАЛЖ были наибольшими.

Высокий уровень ММР-2 и в экссудативную, и в последующую пролиферативную стадию развития процесса, на наш взгляд, объясним следующими фактами. Местоположением ММР-2 (или нейтрофильной желатиназы) в сегментоядерном лейкоците одни исследователи считают азурофильные гранулы, другие — С-частицы, есть мнение, что энзим локализуется в обеих органеллах [2, 4, 13]. Такое расположение металлопротеиназы ведет к росту ее концентрации в первую стадию синдрома, внося свой вклад в повреждение легких, так как основным субстратом фермента является коллаген базальных мембран. Установлено, что ММР-2 также экспрессируется фибробластами в период активной регенерации ткани [10], которая наблюдается в пролиферативную стадию развития ОРДС, поэтому его уровень эту фазу остается высоким. Есть данные, что ММР-2 активирует трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), высвобождая его из матрикса, кроме того, инактивирует важнейший провоспалительный цитокин IL-1 $\beta$  [12]. В связи с этим ММР-2 нельзя однозначно отнести к повреждающим ферментам, так как она способна оказывать значимые протективные эффекты: препятствовать адгезии нейтрофилов к эндотелию и их гиперактивации (нивелируются свойства IL-1 $\beta$ ), а также опосредованно привлекать в очаг моноциты

крови (TGF  $\beta$  является их хемоаттрактантом). Уменьшение количества ММР-2, обнаруженное нами в фибротическую стадию синдрома, вероятно, является одним из механизмов нарушения регенерации поврежденных структур.

### Выводы

Маркерами развития экссудативной стадии экспериментального ОРДС (собственно ОПЛ) являются увеличение концентраций нейтрофильной эластазы и МРО в плазме крови и БАЛЖ.

О пролиферативной фазе синдрома свидетельствует высокий уровень ММР-2 при неизменном содержании эластазы и МРО в плазме крови и БАЛЖ.

Уменьшение концентрации ММР-2 в обеих биологических жидкостях сопутствует развитию фибротической фазы ОРДС.

### Список литературы

1. *Власенко А.В., Мороз В.В., Яковлев В.Н.* и др. Сложности в диагностике острого респираторного дистресс-синдрома // Материалы XII Съезда федерации анестезиологов-реаниматологов России. — Москва, 2010. — С. 92-93.
2. *Галкин А.А., Демидова В.С.* Роль адгезии в активации нейтрофилов в цитотоксическом взаимодействии нейтрофилов с эндотелием // Успехи современной биологии. — 2011. — Т. 131, №1. — С. 62-78.
3. *Григорьев Е.В., Разумов А.С.* Перспективы диагностики синдрома острого повреждения легких // Медицина неотложных состояний. — 2008. — №6 (19). — С. 23-32.
4. *Мальцева В.Н., Сафронова В.Г.* Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология. — 2009. — Т. 51, №6. — С. 467-474.
5. *Мороз В.В., Голубев А.М.* Классификация острого респираторного дистресс-синдрома // Общая реаниматология. — 2007. — Т. III, №5-6. — С. 7-9.
6. *Мороз В.В., Власенко А.В., Голубев А.М.* и др. Дифференцированное лечение острого респираторного дистресс-синдрома, обусловленного прямыми и непрямыми этиологическими факторами // Общая реаниматология. — 2011. — Т. VII, №4. — С. 5-15.
7. Острый респираторный дистресс-синдром / под ред. Б.Р. Гельфанда, В.Л. Кассиля. — М.: Литера, 2007. — 232 с.
8. *Павлов К.А., Дубова Е.А., Мишнев О.Д., Щеголев А.И.* Медиаторные взаимодействия при остром респираторном дистресс-синдроме // Общая реаниматология. — 2007. — Т. III, №5-6. — С. 208-212.
9. *Цыбиков Н.Н., Пруткина Е.В., Сепп А.В., Исакова Н.В.* Способ моделирования острого повреждения легких // Заявка на изобретение РФ №2010130728/14. — 2012. — Бул. №3. Решение о выдаче патента от 31.01.2012.
10. *Шойхет Я.Н., Кореновский Ю.В., Мотин Ю.Г.* и др. Роль матриксных металлопротеиназ при воспалительных заболеваниях легких // Проблемы клинической медицины. — 2008. — №3 (15). — С. 99-101.



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

11. Future research directions in acute lung injury (summary of a National Heart, Lung and Blood Institute Working Group) // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2003. — Vol. 167 (2). — P. 1027-1035.

12. **Hiller O.** Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3 and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of

fibrinogen and factor XII // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 8-13.

13. **Warren L.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.

*Поступила 237.04.12*

### Сведения об авторах:

*Пруткина Елена Владимировна* — к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ

*Сепп Андрей Валентинович* — ассистент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ

*Цыбиков Намжил Нанзатович* — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ