

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

РОЛЬ HSP-70 В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА НА ФОНЕ ГРИППОЗНОЙ ПНЕВМОНИИ

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (Чита)

Исследовали парафиновые срезы легких 35 умерших от гриппа А/Н1N1 во время эпидемии 2009–2010 годов в Забайкальском крае. При аутопсии в 10 случаях диагностирована экссудативная, в 16 – пролиферативная и в 9 – фибротическая стадия острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). Методом иммуногистохимии в срезах определяли экспрессию белка теплового шока 70 (HSP-70) клетками легких. Обнаружили, что HSP-70 экспрессируют нейтрофилы, макрофаги, эндотелиоциты, фибробласты, альвеолоциты 1-го и 2-го типов. Выявлено, что вне зависимости от стадии ОРДС наибольшая экспрессия HSP-70 осуществляется нейтрофилами, самая низкая – эндотелием, альвеолоцитами 2-го типа и фибробластами. Экспрессия HSP-70 в нейтрофилах, макрофагах, фибробластах и альвеолоцитах 1-го типа во все фазы ОРДС была одинаковой. В альвеолоцитах 2-го типа в экссудативную и пролиферативную фазы она была ниже, чем при развитии фиброза. Сделан вывод, что одним из механизмов развития ОПЛ/ОРДС при гриппозной пневмонии является сравнительно невысокий синтез HSP-70 эндотелиоцитами легочных капилляров и альвеолоцитами 2-го типа.

Ключевые слова: пневмония, острый респираторный дистресс-синдром, грипп А/Н1N1, HSP-70

THE ROLE OF HSP-70 IN THE PATHOGENESIS OF RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME INDUCED BY INFLUENZA PNEUMONIA

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

Chita State Medical Academy, Chita

Lung paraffin sections of 35 died during the epidemic of influenza A/H1N1 of 2009–2010 in Zabaikalskiy kraj were investigated. Exudative stage was diagnosed in 10 cases, proliferative stage – in 16 cases and fibrotic stage of acute respiratory distress syndrome (ARDS) was diagnosed in 9 cases at the autopsy. Expression of heat shock protein 70 (HSP-70) by cells of the lungs was determined in sections by immunohistochemistry. We revealed that HSP-70 is expressed by neutrophils, macrophages, fibroblasts and alveolocytes type 1 and 2. It was found that regardless of the stage of ARDS the highest expression of HSP-70 was realized by neutrophils, the lowest – by the endothelium, alveolocytes type 2 and fibroblasts. HSP-70 expression in neutrophils, macrophages, fibroblasts and alveolocytes type 1 was the same in all stages of ARDS. In alveolocytes type 2 in exudative and proliferative phases it was lower than at the development of fibrosis. We concluded that one of the mechanisms of developments of acute lungs injury/acute respiratory distress syndrome at influenza pneumonia is comparatively low synthesis of HSP-70 by endotheliocytes of lung capillary and alveolocytes type 2.

Key words: pneumonia, acute respiratory distress syndrome, influenza A/H1N1, HSP-70

Непосредственной причиной большинства летальных исходов во время прошедшей эпидемии гриппа А/Н1N1 был острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) [6, 11]. В настоящее время ОРДС является значимой проблемой реаниматологии: является наиболее частым осложнением жизнеугрожающих состояний, летальность при нем составляет 80 % и более. В последние годы выделяют раннюю, потенциально обратимую стадию синдрома – острое повреждение легких (ОПЛ). Механизмы перехода ОПЛ в последующие фазы процесса исследованы недостаточно, что делает фундаментальные изыскания в этом направлении особенно актуальными [4].

Основным звеном патогенеза ОПЛ/ОРДС является аккумуляция нейтрофилов в капиллярах и ткани легких, ведущая к повреждению альвеолокапиллярной мембраны с развитием некардиогенного отека. При этом не ясно, почему, несмотря на непереносимое образование нейтрофильных агрегатов в легочных капиллярах при шоках, сепсисе и других состояниях, ОПЛ/ОРДС развивается далеко не во всех случаях [4].

Универсальным ответом живой клетки на воздействие повреждающих факторов, в том числе при воспалении, является синтез белков теплового шока (HSP) [1, 2]. Принцип «повышение уровня HSP-70 – увеличение устойчивости клетки» работает практически без исключений [1, 3, 5]. В связи с этим возникла гипотеза: «локальное нарушение синтеза шаперонов в клетках легких является одним из пусковых механизмов развития ОПЛ/ОРДС».

Целью нашей работы явилось определение экспрессии HSP-70 различными клетками в легких в зависимости от фазы развития ОРДС на фоне гриппозной пневмонии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы парафиновые блоки секционного материала 35 погибших больных во время эпидемии гриппа А/Н1N1 2009–2010 гг. в Забайкальском крае. Среди них было 16 мужчин и 19 женщин в возрасте от 18 до 45 лет. У всех больных диагноз гриппа А/Н1N1 был дополнительно подтвержден посмертно

путем обнаружения в секционных образцах тканей генома вируса методом ПЦР. Анализировались протоколы патологоанатомических исследований и диагнозы аутопсий. Вирусная пневмония была выявлена у 26 человек (74 %), вирусно-бактериальная – у 9 (26 %), во всех случаях были обнаружены патоморфологические маркеры ОРДС. Наиболее частой причиной ко-инфекции являлся *Staphylococcus aureus* [6]. Погибшие были разделены на 3 группы: первая ($n = 10$) – имеющие морфологические маркеры экссудативной (острой) стадии ОРДС; вторая ($n = 16$) – критерии пролиферативной (подострой) фазы; в паренхиме легких больных третьей группы ($n = 9$) были выявлены начальные признаки фибротической стадии [4, 6].

Иммуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах легочной паренхимы биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом. Срезы толщиной 3–4 мкм депарафинизировали и регидратировали по стандартной схеме. В качестве первичных использовали козы антитела к HSP-70 человека, клон К20 («Santa Cruz biotechnology», США). В качестве вторичных применяли биотинилированные анти-козы антитела в составе рекомендованной производителем системы визуализации ABS Staining System («Santa Cruz biotechnology», США), использующей в качестве хромогена 3,3-диаминобензида тетрахлорид. Величину экспрессии HSP-70 в срезе определяли для всех продуцирующих клеток отдельно: при 400-кратном увеличении производился подсчет не менее 100 целевых клеточных элементов в 10 случайно выбранных полях зрения. В каждом поле количественную оценку экспрессии антигена проводили в баллах по следующей шкале: отрицательный уровень – 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 [8].

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ BIOSTAT версии 3.03. При сравнении групп использовали критерий χ^2 , различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты представлены в виде процента полей зрения с соответствующим уровнем экспрессии антигена по отношению к исследованному числу полей в срезе. Количественные данные указаны в виде медианы (Me) и интерквартильного (25-й и 75-й перцентили) интервала.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 1-й группе погибших в случае наступления летального исхода на 1–3-е сутки от начала заболевания (5 наблюдений) в паренхиме легких реализовался комплекс морфологических изменений в виде неравномерно выраженного острого диффузного десквамативно-макрофагального альвеолита. Максимальным был интерстициальный компонент отека легочной паренхимы, также отмечался диффузный, но неравномерный альвеолярный отек. В просвете альвеол отечная жидкость была со значительным количеством белка, наблюдались нейтрофилы, мононуклеарные фагоциты, десквамированные альвеолоциты и эритроциты. В мелких бронхах и бронхиолах помимо комплекса воспалительных изменений отмечалась трансформация мерцательного эпителия (клетки принимали «оплывшую» форму), на поверхности слизистых наблюдались наложения фибриновых пленок и слизи с эритроцитарно-лейкоцитарной примесью. В сосудах микроциркуляторного русла встречались все морфологические варианты тромбов, но значительно чаще – агрегация и сладжирование форменных элементов крови. У умерших на 5–7-е сутки от начала заболевания (5 случаев) дополнительно фиксировались «гиалиновые мембраны», отмечалось присоединение вторичной инфекции с развитием гнойно-геморрагической пневмонии, нередко формировались фокусы микроабсцедирования.

Таблица 1

Уровень экспрессии HSP-70 в экссудативную фазу ОРДС ($n = 10$; 100 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1–2 балла (% полей зрения)	3–4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
Нейтрофилы	0	68	32	–
Макрофаги	42	58	0	$p = 0,000^*$
Эндотелий	87	13	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,000^*$
Фибробласты	81	19	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,004^*$ $p_2 = 0,73$
Альвеолоциты 1-го типа	10	90	0	$p = 0,24$ $p_1 = 0,009^*$ $p_2 = 0,000^*$ $p_3 = 0,000^*$
Альвеолоциты 2-го типа	64,4	35,5	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,13$ $p_2 = 0,07$ $p_3 = 0,25$ $p_4 = 0,000^*$

Примечание: p – значение различий в сравнении с нейтрофилами; p_1 – значение различий в сравнении с макрофагами; p_2 – значение различий в сравнении с эндотелием; p_3 – значение различий в сравнении с фибробластами; p_4 – значение различий в сравнении с альвеолоцитами 1-го типа; * – значимые различия.

В эту фазу HSP-70 продуцировали нейтрофилы, интерстициальные и внутриальвеолярные макрофаги, эндотелиоциты, фибробласты, альвеолоциты 1-го и 2-го типов.

Наибольшая экспрессия белка отмечалась в нейтрофилах, самая низкая – в эндотелии, фибробластах и альвеолоцитах 2-го типа (табл. 1).

У пациентов 2-й группы летальный исход наступал преимущественно на 9–11-е сутки от момента заболевания. В легких этой группы умерших, помимо отека, отмечались: инфильтрация паренхимы нейтрофилами и макрофагами, признаки повреждения аэрогематического барьера, одномоментные организация и лизис «гиалиновых» мембран. Наряду с этим регистрировалась пролиферация сохранившихся альвеолоцитов 2-го типа с их гиперплазией. По мере разрешения от отека и развития репаративных процессов появлялись признаки дифференцировки больших альвеолоцитов в клетки 1-го типа. В зонах перехода терминальных бронхиол в альвеолы регистрировалась доброкачественная плоскокле-

точная метаплазия сохранившегося реснитчатого эпителия.

В эту стадию наибольшая экспрессия HSP-70 зафиксирована нейтрофилами, минимальная – эндотелием, фибробластами и альвеолоцитами 2-го типа (табл. 2).

Пациенты 3-й группы погибли в среднем на 14–16-е сутки от начала заболевания. Микроскопически в паренхиме легких у них доминировали процессы фиброобразования с деформацией и нарушением архитектоники значительной части ацинусов, множественными зонами хронической эмфиземы, модификацией микроциркулярного русла. В интерстиции формировались зоны скопления фибро- и миофибробластов, воспалительный инфильтрат сокращался и приобретал лимфоцитарно-макрофагальный характер. Сосуды характеризовались эффектом перекалибровки за счет утолщения миоинтимальных слоев, приобретали извитую форму. На этом фоне наибольшая экспрессия HSP-70 отмечалась по-прежнему в нейтрофилах (90 % суммарно), а в эндотелиоцитах и фибробластах она была наименьшей (табл. 3).

Таблица 2

Уровень экспрессии HSP-70 в пролиферативную фазу ОРДС (n = 16; 160 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1–2 балла (% полей зрения)	3–4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
Нейтрофилы	0	77	23	–
Макрофаги	48	50	2	$p = 0,000^*$
Эндотелий	77	23	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,003^*$
Фибробласты	73	27	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,009^*$ $p_2 = 0,83$
Альвеолоциты 1-го типа	17	80	3	$p = 0,002^*$ $p_1 = 0,000^*$ $p_2 = 0,000^*$ $p_3 = 0,000^*$
Альвеолоциты 2-го типа	58	42	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,36$ $p_2 = 0,05^*$ $p_3 = 0,12$ $p_4 = 0,000^*$

Примечание: те же, что в таблице 1.

Таблица 3

Уровень экспрессии HSP-70 в фибротической фазу ОРДС (n = 9; 90 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1–2 балла (% полей зрения)	3–4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
Нейтрофилы	10	73	17	–
Макрофаги	40	60	0	$p = 0,017^*$
Эндотелий	73	27	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,019^*$
Фибробласты	60	40	0	$p = 0,000^*$ $p_1 = 0,19$ $p_2 = 0,41$
Альвеолоциты 1-го типа	23	77	0	$p = 0,29$ $p_1 = 0,27$ $p_2 = 0,000^*$ $p_3 = 0,009^*$
Альвеолоциты 2-го типа	33,5	66,5	0	$p = 0,05^*$ $p_1 = 0,79$ $p_2 = 0,004^*$ $p_3 = 0,07$ $p_4 = 0,57$

Примечание: те же, что в таблице 1.

При сравнении уровня экспрессии HSP-70 каждым видом клеток между стадиями процесса получены следующие результаты. Нейтрофилы одинаково активно экспрессировали белок во все фазы ОПЛ/ОРДС ($p = 0,42$). Отсутствие динамики в синтезе HSP-70 также отмечалось в макрофагах ($p = 0,71$), эндотелии ($p = 0,37$), фибробластах ($p = 0,19$) и альвеолоцитах 1-го типа ($p = 0,36$). Исключение составили альвеолоциты 2-го типа: в экссудативную стадию процесса (собственно ОПЛ) и фазу пролиферации синтез белка в них был одинаковым ($p = 0,73$), а в фибротическую он увеличивался и становился выше не только второй стадии ($p = 0,044$), но фазы ОПЛ ($p = 0,029$).

Как и ожидалось, при развитии ОРДС вне зависимости от стадии процесса HSP-70 активно синтезировался всеми клетками легких. Известно, что одним из важнейших эффектов внутриклеточного HSP-70 является защита ингибитора фактора транскрипции I κ B от протеаз. Дополнительное введение шаперона снижает экспрессию транскрипционного фактора NF- κ B, что ведет к угнетению синтеза провоспалительных цитокинов и препятствует избыточной аккумуляции нейтрофилов в легких [10]. Низкая экспрессия HSP-70 эндотелиоцитами во все фазы ОПЛ/ОРДС, с одной стороны, является одним из механизмов их большей уязвимости, способствует инициации и дальнейшему развитию не только повреждения легких, но и диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови — обязательного компонента патогенеза ОРДС. С другой стороны, эндотелиоциты с низким уровнем синтеза шаперона становятся активными продуцентами медиаторов воспаления, стимулируя избыточную инфильтрацию паренхимы легких полиморфноядерными лейкоцитами [7].

При трансформации обратимого ОПЛ в последующие фазы ОРДС синтез HSP-70 альвеолярным эпителием оставался низким, особенно в альвеолоцитах 2-го типа. Сохранность эпителия альвеол является обязательным условием адекватного клиренса бронхоальвеолярной жидкости. Вероятно, именно это звено патогенеза является «точкой приложения» противоотечного эффекта HSP-70, обнаруженного при экспериментальном сепсис-индуцированном ОРДС [9, 10]. Зафиксированная нами меньшая защищенность альвеолярного эпителия 2-го типа против механизмов вторичной альтерации способствует формированию внутриальвеолярного отека, потенцирует нарушение синтеза сурфактанта с формированием множественных микроателектазов и, как следствие, фатальную гипоксию. При развитии фиброза в альвеолоцитах 2-го типа нами было обнаружено увеличение экспрессии шаперона. Для объяснения механизма этого явления мы дополнительно провели следующие расчеты: определили количество альвеолоцитов в срезах альвеол в поле зрения и отношение числа альвеолоцитов 2-го типа к общему количеству эпителиоцитов в альвеоле. Оказалось, что вне зависимости от стадии ОРДС общее количество альвеолоцитов в срезах

альвеолы составило 37 (30; 50) клеток ($p = 0,38$). Соотношение между альвеолоцитами изменялось: в фазу экссудации оно было наименьшим — 0 (0; 0,03) ($p = 0,005$), в пролиферативную — увеличивалось до 0,04 (0; 0,03), оставаясь таким же в стадию фиброза ($p = 0,12$). Исследование с использованием специфических противовирусных антител и электронной микроскопии показали: вирус гриппа А/Н1N1 поражает прежде всего пневмоциты 2-го типа [11], что объясняет низкое количество этих клеток в фазу ОПЛ. В последние годы было доказано, что в пролиферативную стадию ОРДС инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) потенцирует к активной регенерации не только фибробласты, но и альвеолоциты [12, 13]. Следовательно, увеличение экспрессии шаперона происходило не за счет роста его синтеза, а за счет пролиферации альвеолоцитов 2-го типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из механизмов развития ОПЛ/ОРДС при гриппозной пневмонии является сравнительно невысокий синтез HSP-70 эндотелиоцитами легочных капилляров и альвеолоцитами 2-го типа. Низкий синтез шаперона в эндотелии сохраняется во все стадии процесса, а в альвеолоцитах 2-го типа — при трансформации обратимого ОПЛ в последующие стадии. Причины этих нарушений требуют дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евдонин А.А., Медведева Н.Д. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 2. — С. 130–137.
2. Егорова Е.В., Пересторонин В.И., Цыбиков Н.Н. Участие шаперона HSP-70 и аутоантител к нему в развитии хронического гнойного риносинусита [Электронный ресурс] // Забайкальский медицинский вестник. — 2012. — № 2. — С. 20–22. — Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv>.
3. Маргулис Б.А., Гужова И.В. Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 3. — С. 219–228.
4. Острый респираторный дистресс-синдром: практическое руководство / Под ред. Б.Р. Гельфанда, В.Л. Кассиля — М.: Литтера, 2007. — 232 с.
5. Пшенникова М.Г., Зеленина О.М., Круглов С.В., Подкидышев Д.А. и др. Синтез белков теплового шока (HSP70) в лейкоцитах крови как показатель устойчивости к стрессорным повреждениям // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2006. — Т. 142, № 12. — С. 614–617.
6. Чарторижская Н.Н., Сепп А.В., Пруткина Е.В., Цыбиков Н.Н. Морфологическая характеристика поражения дыхательной системы при гриппе А/Н1N1 в Забайкальском крае // Бюл. физиологии и патологии дыхания. — 2011. — Т. 39. — С. 8–12.
7. Юринская М.М., Евгеньев М.Б., Антонова О.Ю., Винокуров М.Г. Экзогенный белок теплового шока HSP-70 подавляет активацию ней-

трофилов человека под действием бактериальных патогенов // Доклады академии наук. – 2010. – Т. 435, № 3. – С. 407–410.

8. Ahasic A.M., Zhai R., Su L. et al. IGF1 and IGF BP3 in acute respiratory distress syndrome // Eur. J. Endocrinol. – 2012. – Vol. 166. – P. 121–129.

9. Aoki M., Nabeshima K., Koga K., Hamasaki M. et al. Imatinib mesylate inhibits cell invasion of malignant peripheral nerve sheath tumor induced by platelet-derived growth factor-BB // Laboratory Investigation. – 2007. – Vol. 87. – P. 767–779.

10. Bromberg Z., Raj N., Goloubinoff P., Deutschman C.S. et al. Enhanced expression of 70-kilodalton heat shock protein limits cell division in a sepsis-induced model of acute respiratory distress

syndrome // Crit. Care Med. – 2008. – Vol. 36, N 1. – P. 246–255.

11. Ganter M.T., Ware L.B., Howard M., Roux J. et al. Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury // Amer. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2006. – Vol. 291. – P. 354–361.

12. Jian X., Li M., Zhang Y. et al. Role of growth factors in acute lung injury induced by paraquat in a rat model // Hum. Exp. Toxicol. – 2011. – Vol. 30 – P. 460–469.

13. Shieh W.-Ju, Blau D.M., Denison A.M. et al. 2009 Pandemic H1N1 Influenza. Pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States // Am. J. Pathol. – 2010. – Vol. 177. – P. 166–175.

Сведения об авторах

Пруткина Елена Владимировна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672090, г. Чита, ул. Горького 39А; тел.: 8 (3022) 32-18-59; e-mail: lenap75@mail.ru).

Сепп Андрей Валентинович – ассистент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672090, г. Чита, ул. Горького 39А; тел.: 8 (3022) 35-37-96; e-mail: andrey82708@gmail.com).

Цыбиков Намжил Нанзатович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672090, г. Чита, ул. Горького 39А; тел.: 8 (3022) 32-18-59; e-mail: thybikov@mail.ru).