ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 616.24-002.2:577.1:612.017.1

Турсунов Джахангир Хусанович - Ph.D., доцент
Сабирова Рихси Абдукадировна - д.м.н., профессор
Ташкентская медицинская академия (Ташкент, Узбекистан)

РОЛЬ БИОМАРКЕРОВ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ В РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

Аннотация. *Роль биомаркеров лёгочной ткани в развитии экспериментальной интерстициальной пневмонии. В данной работе рассмотрено значение биомаркеров лёгочной ткани в условиях экспериментальной интерстициальной пневмонии. Биомаркеры отражают степень воспалительного процесса, повреждение альвеолярных структур и позволяют судить о тяжести и динамике патологических изменений. Анализ их концентрации и активности может быть использован для ранней диагностики, прогноза течения заболевания и оценки эффективности проводимой терапии.*

Ключевые слова: *интерстициальная пневмония; экспериментальная модель; биомаркеры; легочная ткань; воспаление; фиброз легких; цитокины; сурфактантные белки.*

Tursunov Djaxangir Husanovich - Ph.D., dotsent
Sabirova Rixsi Abduqodirovna - t.f.d., professor
Toshkent tibbiyot akademiyasi (Toshkent, O‘zbekiston)

EKSPERIMENTAL INTERSTITSIAL PNEVMONIYA RIVOJLANISHIDA O‘PKA TO‘QIMALARI BIOMARKERLARINING AHAMIYATI

Annotatsiya. *Ushbu tadqiqotda eksperimental pnevmoniya sharoitida o‘pka to‘qimalarida aniqlanadigan biomarkerlarga e’tibor qaratildi. Biologik markerlar yallig‘lanish jarayonining bosqichlarini, hujayra zararlanish darajasini va patologik o‘zgarishlarning og‘irligini baholashda muhim ahamiyat kasb etadi. Ularning dinamikasi kasallik rivojlanish bosqichlarini aniqlash va davolash samaradorligini kuzatishda foydali ko‘rsatkichlar sifatida qaralmoqda.*

Kalit so‘zlar: *interstitsial pnevmoniya; eksperimental model; biomarkyerlar; o‘pka to‘qimasi; yallig‘lanish; o‘pka fibrozisi; sitokinlar; surfaktant oqsillari*

Tursunov Djakhangir Khusanovich - Ph.D., associate professor
Sabirova Rikhsi Abdukadirovna - DSc, professor
T*ashkent Medical Academy (Tashkent, Uzbekistan)*

THE ROLE OF LUNG TISSUE BIOMARKERS IN THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL INTERSTITIAL PNEUMONIA

Summary. *This study focuses on the role of lung tissue biomarkers in the development of experimental interstitial pneumonia. Biomarkers reflect the intensity of inflammation, cellular damage, and the extent of pathological changes in the lung parenchyma. Their dynamic evaluation can provide valuable information for early diagnosis, disease progression monitoring, and assessment of treatment effectiveness.*

Key words: *interstitial pneumonia; experimental model; biomarkers; lung tissue; inflammation; pulmonary fibrosis; cytokines; surfactant proteins*

При воздействии внешних факторов неорганической и органической природы (аллергенов, токсических факторов, фиброгенной пыли) нарушается структура мембраны пневмоцитов, активация синтеза белков, которые рассматриваются как биомаркеры интерстициальных заболеваний легких (ИЗЛ). Сывороточные биомаркеры наряду с компьютерной томографией и показателями внешнего дыхания могут быть использованы при диагностике, оценке активности, тяжести течения интерстициальных заболеваний легких (ИЗЛ), а также как прогностический фактор [9]. Биомаркеры могут применяться также для скринингового исследования при по-

дозрении на профессиональные ИЗЛ. Среди исследуемых биомаркеров ИЗЛ особый интерес вызывают белки, синтезируемые пневмоцитами 2го типа как клетками, непосредственно участвующими в патогенезе этих заболеваний, в процессах повреждения и ремоделирования легочной ткани [9]. К таким белкам относятся прежде всего высокомолекулярный гликопротеин Krebs von den Lungen6 (KL6) и сурфактантные белки SPA и SPD. Значительно реже в качестве биомаркера ИЗЛ используется гликопротеин альвеоломуцин, также синтезируемый пневмоцитами 2го типа.

Изменение уровня пневмопротеинов как специфических маркеров поражения легких и мониторинг заболевания представляют большой научный интерес. Наибольшее значение придается сурфактантному белку D (Surfactant proteins D, SP-D) и гликопротеину 6 фон ден Лунгена (Krebs von den Lungen-6, KL-6) [4].

KL-6 – муциноподобный гликопротеин, экспрессируется в регенерирующих эпителиальных клетках II типа. N. Kohno и соавт. в 1988 г. обнаружили повышенные уровни KL-6 в сыворотке пациентов с аденокарциномой легких. Поздние исследования выявили его ассоциацию с активностью интерстициального пневмонита (1989) и наличием системной склеродермии (ССД) (к 2000 г.) [10, 14]. Показано, что KL-6 связан со стимуляцией фибробластов и ингибированием их апоптоза [8]. Но этот маркер обнаруживается при целом ряде заболеваний, связанных с фиброзом легких. Данные о его специфичности и чувствительности сильно варьируют [5,7]. В результате изучения значимости KL-6 в формировании проявлений ССД показано, что его уровень обратно коррелирует с форсированной жизненной емкостью легких (ФЖЕЛ) и диффузионной способностью легких (ДСЛ) и имеет прямую ассоциацию с рентгенологической прогрессией ИЗЛ [15]. Описана связь колебаний уровня KL-6 с изменением активности заболевания, а также плохой ответ на терапию глюкокортикоидами (ГК) и циклофосфамидом (ЦФ) у пациентов с высокими (>2000 Ед/л) значениями показателя [17]. В то же время связь высоких уровней KL-6 и выживаемости была опровергнута [5]. Данный маркер считается перспективным в оценке тяжести ИЗЛ-ССД.

SP-A и SP-D вырабатываются эпителиоцитами альвеол и клетками Клара. Ввиду того, что эти белки участвуют в снижении поверхностного натяжения в альвеолах на границе воздух–жидкость, их уровень в крови отражает степень повреждения гематоальвеолярного барьера [11]. Первоначально концентрации SP-A и SP-D в амниотическом аспирате использовались как маркер зрелости легких плода. Также выявлена связь между концентрацией SP в крови и бронхоальвеолярных смывах и наличием у пациентов острого респираторного дистресс-синдрома, аденокарциомы легких и ряда других заболеваний [6]. Впоследствии интерес к SP-A снизился ввиду его значимо меньшей чувствительности и специфичности по сравнению с SP-D [2]. В исследовании M.Elhai и соавт. показана связь сочетания повышенных уровней SP-D с анти Scl-70 и риском развития ИЗЛ-ССД. На основании его концентрации в крови выделены 3 группы пациентов: с низким, умеренным и высоким риском развития поражения легких.

Однако выявлено отсутствие прогностической значимости данного маркера для скорости развития ИЗЛ [5]. По результатам российских исследований, как и в случае с KL-6, сывороточный уровень SP-D находился в обратной корреляционной зависимости с форсированной жизненной емкостью легких (ФЖЕЛ) и ДСЛ и имел прямую ассоциацию с рентгенологической прогрессией; также была установлена прямая корреляция его уровня с наличием гастроэзофагеального рефлюкса при ССД-ИЗЛ [16]. Кроме того, показана связь снижения концентрации SP-D при использовании циклофосфамида и глюкокортикоидов с хорошим ответом на данную терапию (при оценке ФЖЕЛ) [17].

В настоящее время неясны отдельные звенья этиопатогенетических механизмов участие системы белков легочного сурфактанта A и D (SP-A, SP-D) в ответе на патогенную инвазию. Исследования роли белков сурфактанта носят фрагментарный и нередко противоречивый характер [11,18]. Однако, по имеющимся на сегодняшний день данным, можно с уверенностью говорить о важной, одной из ключевых ролей SP-A и SP-D в патогенезе пневмоний – развитии жизнеугрожающих осложнений [3, 12, 13, 18].

Сурфактантные белки представлены белками: SP-A (~5,3%), SP-D (~0,6%), SP-B (~0,7%) и SP-C (~0,4%). Все белки сурфактанта обладают способностью к интернализации. Основная функция ПАВ реализуется за счет содержания как раз этих четырех связанных белков, каждый из которых в отдельности относительно хорошо изучен [7]. SP-A и SP-D – более крупные гидрофильные гликопротеины, играют значительную роль в системе защиты легких [2, 18,], напротив, SP-B и SP-C – полипептиды с высокой гидрофобностью, но значительно меньшие по размерам, выполняют ключевую роль в альвеолярной стабильности: снижают поверхностное натяжение, тем самым предотвращают альвеолярный коллапс [21]. Белки SP-A и SP-D относится к семейству коллектинов типа С, активно участвуют в ранней противоинфекционной защите респираторного тракта [13,18]. SP-A, являясь частью системы врожденного иммунитета, способен посредством взаимодействия с дендритными клетками и Т-клетками регулировать иммунный ответ в легких [18].

Дендритные клетки не только обладают фагоцитирующей способностью, но и (в «зре-

лом» виде) презентируют антиген Т-клеткам, а также стимулируют Т-клетки в региональных лимфатических узлах и тканях. SP-A ингибирует пролиферацию Т-клеток двумя способами: во-первых, опосредованно, т.е. через торможение созревания дендритных клеток, во-вторых, путем прямого взаимодействия с Т-клетками. Одна из основных задач SP-A – предотвратить чрезмерную активацию каскадов воспалительного ответа, что потенциально может привести к повреждению легочной ткани и, как следствие, к нарушению газообмена.

В качестве биомаркеров сывороточные уровни SP-A и SP-D определены и для других легочных заболеваний, включая хроническую обструктивную болезнь легких [3], прогрессирующий системный склероз [7], интерстициальные заболевания легких (в том числе ассоциированные с ревматоидным артритом) [6], играют важную роль в дифференциальной диагностике и имеют прогностическое значение.

Целью данной работы является исследование биомаркеров легких при интерстициальной пневмонии и их коррекция.

Материал и методы исследования. Для исследования использованы 64 белые беспородные крысы, массой тела 150 – 200 г, у которых вызывали интерстициальную пневмонию путём хронического воздействия табачного дыма в специальной камере [19], в течение 2 месяцев. Все исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1986).

Для количественной оценки биомаркеров легких использовали энзимный иммуноанализ (ELISA), при этом определяли количественные изменения уровней SP-A и SP-D в крови. Этот метод основан на использовании специфических антител, которые связываются с целевым белком, что позволяет измерить его концентрацию. ELISA является высокочувствительным методом, который позволяет выявить даже малые изменения в уровнях этих белков.

Антиген KL-6 (или Sialylated carbohydrate antigen KL-6) представляет собой углеводный маркер, который является синонимом гликопротеина, присутствующего в клетках альвеолярного эпителия легких. KL-6 является высоко специфическим биомаркером для диагностики различных заболеваний легких, таких как идиопатический легочный фиброз, интерстициальные болезни легких, а также рак легких. В связи с этим его определение в сыворотке крови является важным инструментом для диагностики и мониторинга течения заболеваний, связанных с повреждением легочной ткани.

Уровень KL-6 в сыворотке крови определили иммуноферментным методом (ELISA), который основан на специфическом связывании антигена KL-6 с антителами, которые взаимодействуют с ним в ходе реакции. Важным аспектом является использование антител, которые направлены именно на гликопротеиновый антиген KL-6. В результате реакции образуется окрашенное соединение, интенсивность которого пропорциональна количеству антигена KL-6 в образце.

Крысы были распределены по группам следующим образом:

I группа. Интактные крысы, с которыми не проводились манипуляции;

II группа. Контрольная – крысы с интерстициальной пневмонией получали 2 мл очищенной воды.

III группа. Опытные – крысы в этой группе получали водный раствор экдистена в дозе 2,4 мг на 100 гр массы тела на фоне пневмонии;

IV группа. Опытные – крысы в этой группе получали водный раствор ацетилцистеин – АЦЦ в дозе 1,9 мг на 100 гр массы тела на фоне пневмонии;

V группа. Опытные – крысы в этой группе получали водный раствор полиоксидоний в дозе 33,3 мг на 100 гр массы тела на фоне пневмонии;

VI группа. Опытные – крысы в этой группе получали комбинированное лечение экдистен + ацетилцистеин на фоне пневмонии;

VII группа. Опытные – крысы в этой группе получали комбинированное лечение экдистен + полиоксидоний на фоне пневмонии;

VIII группа. Опытные – крысы в этой группе получали комбинированное лечение экдистен+ацетилцистеин+полиоксидоний на фоне пневмонии.

После завершения затравки кроликов декапитировали и забирали кровь и лёгкие. Кровь стабилизировали 3,8%ным раствором цитрата натрия в соотношении 1:9.

Препараты вводили после получения модели интерстициальной пневмонии в течение 15 суток один раза в день per os.

В период проведения эксперимента на 21 день исследования наблюдали летальный исход у одной крысы.

По истечении эксперимента, животных декапитировали и собирали кровь, в качестве стабилизатора использовали 3,8%й раствор цитрата натрия.

Результаты и их обсуждение: В рисунке представлены данные по определению сурфактантных белков у крыс интактной группы и контрольной с интерстициальной пневмонией. В интактной группе крыс уровень SP-A и SP-D составил 25,5±0,4 нг/мл и 243,5±7,8 нг/мл соответственно, а уровень KL-6 445±8,7 Ед/ммоль. Эти показатели являются референтными (нормальными) для здоровых животных.

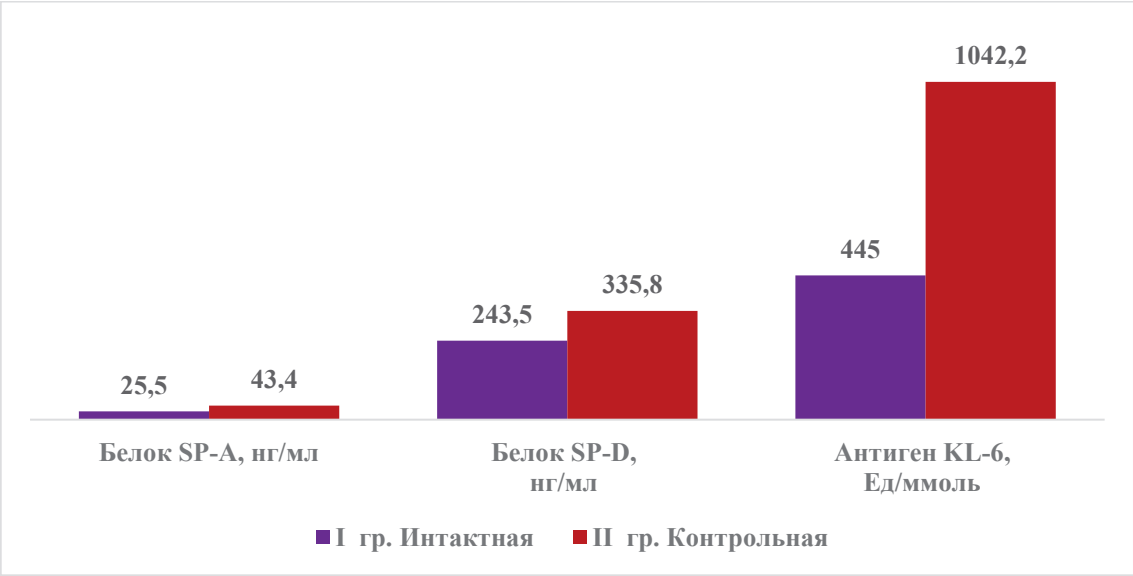


Рис. **Содержание сурфактантных белков у крыс интактной группы и контрольной с интерстициальной пневмонией**

Как видно из рисунка у животных контрольной группы содержание SP-A и SP-D увеличился 70,2 и 37,9% соответственно по сравнению с интактной группой. В то же время нами установлено резкое увеличение KL-6 и оно составило 2,34 раза по сравнению с интактной группой. Полученные данные показывают на то, что развитие пневмонии приводит к значительному повышению всех маркеров, что указывает на повреждение альвеолярного эпителия, воспаление и нарушения функции сурфактантной системы.

В III-й группе (экдистен + пневмония) наблюдалось уменьшение показателей, например SP-A уменьшился до 28,5 ± 1,1 нг/мл, SP-D до 272,5 ± 8,2 нг/мл, а уровень KL-6 уменьшился до 788,6 ± 8,5 Ед/ммоль, что говорит о том, что введение Экдистена уменьшает уровень воспаления и повреждения альвеол, о чем свидетельствует снижение KL-6, SP-A и SP-D по сравнению с контрольной группой пневмонии (табл.). Однако уровень показателей остается выше, чем у интактных животных, что говорит о сохранении воспалительного процесса.

Таблица

Уровень сурфактантных белков SP-A и SP-D и антигена KL-6 в крови у крыс на фоне пневмонии и под влиянием исследуемых лекарственных препаратов

№	Группа животных	Показатели		
		Белок SP-A, нг/мл	Белок SP-D, нг/мл	Антиген KL-6, Ед/ммоль
1	I гр. Интактные	25,5 ± 0,4	243,5 ± 7,8	445 ± 8,7
2	II гр. Контроль пневмония	43,4 ± 1,2 P<0,05	335,8 ± 11,2 P<0,05	1042,2 ± 16,5 P<0,05
3	III гр. экдистен + пневмония	28,5 ± 1,1 P<0,05	272,5 ± 8,2 P<0,05	788,6 ± 8,5 P<0,05
4	IV гр. АЦЦ + пневмония	38,5 ± 1,4 P<0,05	305,2 ± 9,4 P<0,05	895,5 ± 10,2 P<0,05
5	V гр. Полиоксидоний + пневмония	35,5 ± 0,9 P<0,05	296,5 ± 7,6 P<0,05	645 ± 9,7 P<0,05
6	VI гр. экдистен + Ацетилцистеин + пневмония	27,7 ± 0,8 P<0,05	263,5 ± 7,5 P<0,05	545 ± 6,2 P<0,05
7	VII экдистен + полиоксидоний + пневмония	26,8 ± 0,5 P<0,05	260,7 ± 6,6 P<0,05	521 ± 5,5 P<0,05
8	VIII гр. экдистен+ ацетилцистеин+ полиоксидоний +пневмония	25,8 ± 0,3 P<0,05	252,4 ± 5,6 P<0,05	465,4 ± 13,5 P<0,05

В IV й группе (АЦЦ + пневмония) наблюдалось незначительное снижение SP-A и SP-D на 11,3 и 9,9% соответственно по сравнению с контрольной группой. В этой группе содержание KL-6 снизилось на 14,1% по сравнению с контрольной группой. Эти данные указывают на то, что влияние на SP-A не столь выражено, что подтверждает отсутствие значительного противовоспалительного эффекта АЦЦ.

В V й группе введение полиоксидония крысам с интерстициальной пневмонией оказало выраженное противовоспалительное действие, о чем свидетельствует снижение KL-6 в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой. Однако уровни SP-A и SP-D снижены соответственно на 18,2 и 11,7%, что говорит о частичном сохранении воспалительного процесса.

В VI й группе (экдистен + ацетилцистеин + пневмония) - комбинация экдистена и АЦЦ привело к более выраженному снижению маркеров воспаления по сравнению с их отдельным применением. Содержание SP-A и SP-D соответственно снижено на 36,2 и 21,5% по сравнению с контрольной группой. Особенно заметно снижение KL-6, оно составило 47,7% по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о восстановлении альвеолярного эпителия и уменьшении воспаления.

В VII й группе (экдистен + полиоксидоний + пневмония) содержание SP-A и SP-D снизилось на 38,25 и 22,37% соответственно по сравнению с контрольной группой. А содержание KL-6 по сравнению с контрольной группой снижено 2 раза. Под влиянием экдистена и полиоксидония изученные показатели приближаются к данным интактной группы.

В VIII й группе (экдистен + ацетилцистеин + полиоксидоний + пневмония) наблюдалось наибольшее снижение уровня воспалительных маркеров, например уровень SP-A был снижен до 59,4% по сравнению с контролем, что составило 25,8±0,3 нг/мл, а уровень SP-D снизился на 33% и составил 252,4±5,6 нг/мл, а уровень KL-6 почти восстановился до нормы и составил 465,4 ± 13,5 Ед/ммоль.

Таким образом, комплексная терапия экдистен + ацетилцистеин + полиоксидоний показала наилучшие результаты, максимально приближая показатели SP-A, SP-D и KL-6 к значениям интактной группы. Это свидетельствует о синергетическом эффекте препаратов: экдистен – восстановление альвеолярного эпителия, АЦЦ – улучшение мукоцилиарного клиренса, полиоксидоний – модуляция иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blasi F, Mantero M, PierAchille S, Tarsia P. Understanding the burden of pneumococcal disease in adults. Clin Microbiol Infect. 2012;18(Suppl.5):7-14. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012. 03937.x;

2. Bonhomme O. André B., Gester F. et al. Biomarkers in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: review of the literature. Rheumatology (Oxford) 2019;58(9):1534–46. DOI: 10.1093/rheumatology/kez230.

3. Christmann U, Buechner-Maxwell VA, Witonsky SG, Hite RD. The role of pulmonary surfactant in respiratory diseases: Current knowledge in large animal health. J Vet Intern Med. 2009; 23:227-42. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008. 0269.x

4. Distler O., Assassi S., Cottin V. et al. Predictors of progression in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease. Maher Eur Respir J 20 20;55(5):1902026. DOI: 10.1183/13993003.020 26 2019 PMID: 32079645.

5. Elhai M., Hoffmann-Vold A.M., Avouac J. et al. Performance of candidate serum biomarkers for systemic sclerosis-interstitial lung disease. Arthritis Rheumatol 2019;71(6):972–82. DOI: 10.1002/art.40 815.

6. Guiot J., Moermans C., Henket M. et al. Blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. Lung 2017;195(3):273–80. DOI: 10.1007/s00408-0 17-9993-5.

7. Hu Y., Wang L.S., Jin Y.P. et al. Serum Krebs von den Lungen-6 level as a diagnostic biomarker for interstitial lung disease in Chinese patients. Clin Respir J 2017;11(3):337–45. DOI: 10.1111/crj.12 341;

8. Ishikawa N., Hattori N., Yokoyama A. et al. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. Respir Investig 2012;50 (1) :3–13.

9. Kinnula V.L., Ishikawa N., Bergmann U. et al. Proteomic approaches for studying human parenchymal lung diseases. Exp. Rev. Proteomics. 2009; l (6): 619–629.

10. Kohno N., Akiyama M., Kyoizumi S. et al. Detection of soluble tumor-associated antigens in sera and effusions using novel monoclonal antibodies, KL-3 and KL-6, against lung adenocarcinoma. Jpn J Clin Oncol 1988;18(3):203–16. PMID: 3411786.

11. Kuroki Y., Takahashi H., Chiba H. et al. Surfactant proteins A and D: disease markers. Biochim Biophys Acta 1998;1408(2–3): 334–45. DOI: 10.10 16/s0925-4439(98)00079-9.

12. Modified IDSA/ATS minor criteria for severe community-acquired pneumonia best predicted mortality. Medicine (Baltimore). 2019;98(33):e169 14. doi: 10.1097/md.0000000000016914

13. Mulugeta S, Beers MF. The surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. Microbes Infect. 2006; 8:2317-23. doi: 10.1016/j.micinf.2006.04.009.

14. Nagaoka T., Hasegawa M. et al. Elevated serum KL-6 levels in patients with systemic sclerosis: association with the severity of pulmonary fibrosis. Dermatology 2000;200(3):196–201. DOI: 10.1159/000018382.

15. Nihtyanova S.I., Sari A., Harvey J.C. et al. Using autoantibodies and cutaneous subset to develop outcome-based disease classification in systemic sclerosis. Arthritis Rheumatol 2020;72(3):465–76. DOI: 10.1002/art.41153.

16. Sosnovskaya A.V., Fomin V.V., Popova E.N. et al. Clinical value of surfactant protein D as a biomarker of pulmonary fibrosis in patients with scleroderma systematica in relation to the presence of gastroesophageal reflux. Ter Arck 2015;87(3):47. DOI: 10.17116/ terarkh201587342-47.

17. Sumida H., Asano Y., Tamaki Z. et al. Prediction of therapeutic response before and during i.v. cyclophosphamide pulse therapy for interstitial lung disease in systemic sclerosis: a longitudinal observational study. J Dermatol 2018;45(12):1425–33. DOI: 10.1111/1346-8138.14669.

18. Vieira F, Kung J, Bhatti F. Structure, genetics and function of the pul monary associated surfactant proteins A and D: The extra-pulmonary role of these C type lectins. Annals of Anatomy– Anatomischer Anzeiger. 2017; 211:184-201. doi: 10.1016/j.aanat.2017.03.002

19. Курляндского (Каюмова Ю.Д., Таджиходжаева Ю.Х. Экспериментальная модель хронической обструктивной болезни лёгких с табакокурением в изучении мембранодеструктивных процессов // Вестник ассоциации пульмонологов центральной азии. 2020; выпуск 18 (№1-4), С.22-26.)