

Оценка экспрессии эндотелиальных и некоторых маркеров воспаления в экспериментальной модели острого респираторного дистресс-синдрома

Ж.Ю. Устенко, А.И. Савватейкина, А.А. Сапрыкина, Я.А. Гущин, М.Н. Макарова

АО Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», Кузьмоловский Ленинградской области, Россия

Резюме. Введение. Цитокины играют важную роль в качестве сигнальных молекул, которые инициируют, усиливают и закрепляют воспалительную реакцию в патогенезе острого респираторного дистресс-синдрома. Цели исследования – в рамках модели на крысах выявить наиболее показательные для описанной патологии иммуногистохимические маркеры и области их исследования, установить оптимальный возраст животных для индукции острого респираторного дистресс-синдрома.

Материалы и методы. Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование срезов легких крыс интактных групп и групп с липополисахарид-индуцированной моделью патологии в трех областях – слизистой оболочки бронхов, консолидации легкого и неизменной паренхимы. И интактная группа, и группа с моделью патологии были представлены в двух возрастных категориях. Сравнивали микроскопическую картину, количество бокаловидных клеток, выраженность иммуногистохимической реакции на IL-1 β , IL-6, TNF- α , Ki-67 и CD31.

Результаты. В обеих группах с моделированием патологии установлено заметное увеличение количества бокаловидных клеток. Базальные уровни IL-1 β и пролиферативная активность в легких возрастают к 8–10-недельному возрасту по сравнению с возрастом 4–6 недель, а площадь капиллярной сети, напротив, снижается. В группе со сформированной патологией наблюдали возрастание уровня IL-1 β у животных в возрасте 4–6 недель во всех исследуемых областях, а у животных в возрасте 8–10 недель только в области неизменной паренхимы. Относительная плотность капиллярной сети легких снизилась в группе с моделированием патологии в возрасте 4–6 недель.

Заключение. В качестве иммуногистохимических маркеров выраженности острого респираторного дистресс-синдрома на 4-й день развития патологии можно рекомендовать IL-1 β как воспалительный цитокин и CD31 как эндотелиальный маркер, отражающий изменения плотности сосудистой сети. Возраст животных 4–6 недель в ходе этого исследования оказался более стабильным в отношении изменения маркеров и, на наш взгляд, является предпочтительным.

Ключевые слова: IL-1 β , TNF- α , Ki-67, CD31, респираторный дистресс-синдром, липополисахарид, легкие

Для корреспонденции: Жанна Юрьевна Устенко. E-mail: ustenko.ju@doclinika.ru

Для цитирования: Устенко Ж.Ю., Савватейкина А.И., Сапрыкина А.А., Гущин Я.А., Макарова М.Н. Оценка экспрессии эндотелиальных и некоторых маркеров воспаления в экспериментальной модели острого респираторного дистресс-синдрома. Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):70–78. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.70-78.

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Статья поступила 17.01.2024. Получена после рецензирования 01.03.2024. Принята в печать 01.04.2024.

Evaluation of the expression of endothelial and some inflammation markers in an experimental acute respiratory distress syndrome model

Zh. Yu. Ustenko, A.I. Savvateikina, A.A. Saprykina, Ya.A. Gushchin, M.N. Makarova

Research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY" JSC, Kuzmolovsky, Leningrad oblast, Russia

Abstract. Introduction. In the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS), signaling molecules such as cytokines play an important role in initiating, enhancing, and consolidating the inflammatory response. We aimed to identify the most indicative immunohistochemical markers for ARDS and the areas of studying them and to establish the optimal age of animals (i.e., rats) for ARDS induction.

Materials and methods. We conducted a histological and immunohistochemical study of rats' lung sections in two intact groups and two groups with a lipopolysaccharide-induced model of ARDS in three areas: bronchial epithelium, lung consolidation, and unchanged parenchyma. The rats were also divided into two age groups. We compared a microscopic appearance, the number of goblet cells, and immunohistochemical expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , Ki-67, and CD31.

Results. Both groups saw a significant increase in the number of goblet cells. At 8–10 weeks of age, the rats developed increased basal levels of IL-1 β and proliferative activity in the lungs; the area of the capillary network decreased. In the experimental groups, the animals aged 4–6 weeks showed an increase in the level of IL-1 β in all lung areas; however, in the animals aged 8–10 weeks, we observed this growth only in the area of unchanged parenchyma. The relative density of the capillary lung network decreased in the ARDS group aged 4–6 weeks.

Conclusion. We would recommend IL-1 β as an inflammatory cytokine and CD31 as endothelial marker, which reflects changes in vascular density, as immunohistochemical markers of ARDS severity on day 4 of its development. Marker changes are more stable in the 4–6-week-old animals.

Keywords: IL-1b, TNF- α , Ki-67, CD31, respiratory distress syndrome, lipopolysaccharide, lung

Corresponding author: Zhanna Yu. Ustenko. E-mail: ustenko.ju@doclinika.ru

For citation: Ustenko Zh. Yu., Savvateikina A.I., Saprykina A.A., Gushchin Ya.A., Makarova M.N. Evaluation of the expression of endothelial and some inflammation markers in an experimental acute respiratory distress syndrome model. *Clin. exp. morphology.* 2024;13(3):70–78 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.70-78.

Funding. The study was carried out without sponsorship.

Received 17.01.2024. **Received in revised form** 01.03.2024. **Accepted** 01.04.2024.

Введение

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) – это синдром дыхательной недостаточности, в основе которого лежит остро возникающее диффузное воспалительное поражение легких, развивающееся как неспецифическая реакция на различные прямые и системные повреждающие факторы [1, 2]. ОРДС характеризуется острой экссудативной фазой, сочетающей диффузное повреждение альвеол и отек легких, за которой следует более поздняя фибропролиферативная фаза.

Во время острой экссудативной фазы происходит активация моноцитов и макрофагов. Эта активация стимулирует высвобождение первой волны цитокинового сигнала: фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и интерлейкина-1 β (IL-1 β). Эти ключевые цитокины воздействуют на лейкоциты и иные типы клеток, инициируют каскад вторичных цитокинов и высвобождают другие растворимые медиаторы [3]. Активация нейтрофилов приводит к повреждению эндотелия капилляров и эпителии альвеол. В результате трансудат проникает в легочную паренхиму и альвеолярное пространство, что приводит к нарушению газообмена. Последующее разведение сурфактантных белков вызывает альвеолярный коллапс и снижение эластичности легких.

При прогрессировании патологического процесса начинает развиваться фибропролиферативная фаза, характеризующаяся диффузным фиброзом и облитерацией альвеолярных пространств [4].

Важную роль в патогенезе ОРДС играют цитокины. Двумя наиболее важными цитокинами раннего реагирования являются TNF- α и IL-1 β [5]. TNF α стимулирует хемотаксис, активацию нейтрофилов, индуцирует апоптоз, способствует развитию отека. IL-1 β индуцирует рекрутирование и активацию нейтрофи-

лов, увеличивает проницаемость сосудов [6, 7]. Еще один важный цитокин, IL-6, продуцируется широким спектром клеток в ответ на стимуляцию эндотоксинами, IL-1 β , TNF- α . Он имеет решающее значение для дифференцировки цитотоксических Т-клеток, функции макрофагов, продукции белков острой фазы [6]. Также важную роль в развитии ОРДС играет реакция эндотелиальных клеток на высвободившиеся цитокины [8, 9].

Мы в своей работе изучали выраженность иммуногистохимической реакции на воспалительные цитокины IL-1 β , IL-6, TNF- α , маркера эндотелиальных клеток CD31 и пролиферативного маркера Ki-67 в тканях интактных крыс и крыс со сформированным ОРДС разного возраста.

Цель исследования – установить оптимальный возраст животных для индукции ОРДС и локализацию изменений иммуногистохимической реакции на IL-1 β , IL-6, TNF- α , CD31 и Ki-67.

Материалы и методы

В исследовании использовали самок крыс Вистар двух возрастных групп – 4–6 недель ($n=20$) и 8–10 недель ($n=20$) (питомник НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). В каждой возрастной группе животных распределяли по 10 голов в интактную группу и в группу, у которой моделировали ОРДС (табл. 1). Расчет объема выборки проведен на основании метода уравнения ресурсов [10].

Животных содержали в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Данное исследование было рассмотрено биоэтической комиссией НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» и одобрено для проведения биоэтической комиссией (БЭК 1.17/22 от 29.04.2022).

Характеристика экспериментальных групп | Description of the experimental groups

Номер группы Group number	Возраст, группа Age, group	Число животных в группе Number of animals in the group	Масса животных, г Animals' weight, g	Исследуемые объекты Studied objects	Доза ЛПС, мг/кг LPS dose, mg/kg
1	4–6 недель, контроль 4–6 weeks, control	10	100–150	–	0
2	8–10 недель, контроль 8–10 weeks, control	10	200–260		
3	4–6 недель, ОРДС 4–6 weeks, ARDS	10	100–150	Индуктор патологии ЛПС ARDS inducer	15
4	8–10 недель, ОРДС 8–10 weeks, ARDS	10	200–260		

Животным, входящим в группы с модельной патологией ОРДС, вводили индуктор патологии липополисахарид (ЛПС), выделенный из *E. coli* штамм O111:B4 (Sigma-Aldrich, США), однократно эндотрахеально в объеме 2 мл/кг, приготовленный в физиологическом растворе, без применения наркоза. Животные интактной группы индуктор патологии не получали.

Все животные были выведены из эксперимента на 4-й день (72 часа после введения индуктора патологии). Вывод из эксперимента осуществлялся посредством введения пропофола в дозе 60–80 мг/кг с последующим извлечением легких для патоморфологического исследования.

Для гистологического и иммуногистохимического исследования отобранные образцы легких фиксировали в 10% формалине и подвергали стандартной гистологической проводке. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм. Срезы для гистологического и гистохимического исследования депарафинизировали, затем промывали в дистиллированной воде и окрашивали гематоксилином и эозином, а также альциановым синим.

Для иммуногистохимического исследования в качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела к IL-1 β в разведении 1:100 (Abcam, США) и кроличьи моноклональные антитела к IL-6 в разведении 1:200 (Huabio, Китай) с экспозицией 1 час, кроличьи поликлональные антитела к Ki-67 в разведении 1:750 (Abcam, США) с экспозицией 1,5 часа, кроличьи поликлональные антитела к TNF- α (MyBioSource, США) в разведении 1:150, кроличьи моноклональные антитела к CD31 в разведении 1:1000 (Abcam, США) с экспозицией 2 часа. В качестве системы визуализации для первичных антител была использована полимерная система детекции PrimeVision («ПраймБиоМед», Россия). Для маркеров CD31 и Ki-67 проводили докрасивание в гематоксилине в течение 10 секунд для дальнейшей визуализации ядер.

Специфичность окрашивания предварительно проверяли, окрашивая контрольные ткани. Для IL-1 β и IL-6

в качестве контрольной ткани использовали срез лимфатического узла крысы (лимфоидные клетки – положительный контроль антигена, клетки эндотелия и капсулы лимфоузла – отрицательный контроль антигена). Для TNF- α в качестве контрольной ткани использовали срез легкого крысы (лимфоидные клетки – положительный контроль антигена, эндотелиоциты – отрицательный контроль антигена). Для Ki-67 в качестве контрольной ткани использовали срез аденокарциномы молочной железы человека (опухолевые клетки – положительный контроль антигена) и печени крысы (гепатоциты – отрицательный контроль антигена). Для CD-31 в качестве контрольной ткани использовали срез почки крысы (эндотелиоциты клубочков – положительный контроль антигена, соединительная ткань капсулы почки – отрицательный контроль антигена). Все используемые нами антитела продемонстрировали специфичное окрашивание на соответствующих тканях. Наряду с этим для каждой окраски делали дополнительный срез легкого с экспериментального блока для постановки отрицательного контроля реагентов.

Морфологический анализ проводили при помощи светооптического микроскопа «Микромед-3» (U3) (Россия) при $\times 50$, $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры TOUPCAM UCMOS05100KPA (ToupTek, КНР) и программного обеспечения ToupView 3.7.7892.

При исследовании срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, проводили оценку микроскопических изменений и устанавливали факт развития ОРДС. Также проводили количественную оценку бокаловидных клеток в бронхах среднего калибра на стеклах, окрашенных альциановым синим.

Для маркеров TNF- α , IL-1 β морфометрический анализ осуществляли в трех областях – слизистой оболочки бронхов, очагов консолидации легкого и неизменной паренхимы легкого на периферии очага консолидации. Подсчет вели в трех полях зрения для каждой области при $\times 400$. Среднее из трех значений было представлено как количественные данные образца.

Подсчитывали процент площади положительно окрашенной ткани относительно всей площади ткани в полях зрения путем деления числа положительно окрашенных пикселей на общее число пикселей, содержащихся в образце ткани. Полученные данные рассматривали как количественное отражение концентрации цитокина в исследуемой области. Вычисление числа пикселей проводили на микрофотографиях выбранных полей с использованием программного обеспечения QuPath-0.3.2.

Для маркеров CD31 и Ki-67 морфометрический анализ осуществлялся в случайно выбранных областях. Подсчет вели в пяти полях зрения при $\times 400$.

Для Ki-67 вычисляли индекс пролиферации по следующей формуле:

$$I_{\text{Ki-67}} = \frac{N^+}{S} \times 1\,000\,000,$$

где $I_{\text{Ki-67}}$ – индекс пролиферации, N^+ – количество положительно окрашенных на Ki-67 клеток, S – общая площадь ткани в поле зрения, выраженная в пикселях.

Индекс умножали на 1 000 000 для удобства представления данных. Количество положительно окрашенных клеток считали вручную. Для маркера CD31 считали процент площади капиллярной сети относительно площади ткани путем деления числа положительно окрашенных пикселей на общее число пикселей, содержащихся в образце.

Данные о содержании IL-6 исключены из исследования вследствие технической ошибки при проведении иммуногистохимической реакции на некоторых стеклах и как следствие невозможности получения полных данных от всех животных.

Данные проверяли на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения рассчитывали среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (SEM). При несоответствии данных закону нормального распределения рассчитывали медиану (Me) и квартильный размах ($Q1$; $Q3$).

Для оценки независимых данных с признаками нормального распределения (количество бокаловидных клеток) использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). В случае обнаружения достоверного влияния исследуемого фактора последующие межгрупповые сравнения (post hoc analysis) проводили с использованием критерия Тьюки.

Для анализа данных, не подчиняющихся закону нормального распределения (уровни иммуногистохимической экспрессии IL-1 β , TNF- α , Ki-67 и CD31), использовали критерий Манна–Уитни, сравнивая попарно группы 1 и 3 и группы 2 и 4. Различия определяли при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad-Prism 9.1.1.

Результаты

При исследовании срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и альциановым синим, установлен факт формирования патологии на основании обнаружения следующих признаков в группах с моделированием ОРДС (группы 3 и 4): очаги умеренной и выраженной лейкоцитарной, преимущественно нейтрофильной, инфильтрации, скопление нейтрофильных гранулоцитов в просвете средних и крупных бронхов, очаги некроза, наличие гиалиновых мембран (рис. 1 А). Также наблюдались признаки отека, кровоизлияний и очаги консолидации (ателектаза) легких. Три последних признака выявили и в контрольной группе, в менее выраженной степени.

При исследовании срезов, окрашенных альциановым синим, установлено заметное увеличение количества бокаловидных клеток в группах с моделированием ОРДС (табл. 2). Возрастные отличия в количестве бокаловидных клеток не выявлены.

При оценке срезов, подвергнутых иммуногистохимическому окрашиванию на IL-1 β , IL-6, TNF- α , наблюдали положительное окрашивание цитоплазмы эпителиальных клеток и цитоплазмы иммунных клеток, инфильтрирующих паренхиму легкого и находящихся в просвете альвеол, а также положительное окрашивание межклеточного вещества (рис. 1 В–D). При исследовании слизистой оболочки бронхов, окрашенных на IL-1 β , наблюдали также участки ядерного положительного окрашивания эпителиальных клеток. В срезах, окрашенных на CD31, отметили положительное мембранное и цитоплазматическое окрашивание эндотелиоцитов (рис. 1 E), а в срезах, окрашенных на Ki-67, – ядерное положительное окрашивание иммунных клеток и альвеолоцитов (рис. 1 F).

При сравнении данных по базальной иммуногистохимической реакции на IL-1 β , полученных из одинаковых областей контрольных групп разного возраста (группы 1 и 2), отмечено, что ее уровни в легких возрастают к 8–10-недельному возрасту по сравнению с возрастом 4–6 недель (рис. 2). Статистически значимое увеличение обнаруживается при исследовании слизистой оболочки бронхов. При исследовании неизменных областей паренхимы и области консолидации тенденция к увеличению сохраняется, однако в данном исследовании различия оказались статистически незначимыми. Также в контрольных группах к 8–10-недельному возрасту наблюдалась тенденция к возрастанию индекса пролиферации Ki-67. Относительная площадь капиллярной сети легких (CD31-положительно окрашенная площадь), напротив, достоверно уменьшалась (рис. 3). Сравнение выраженности иммуногистохимической реакции на TNF- α не выявило статистически значимых различий между контрольными группами разного возраста (группы 1 и 2), однако, как и в случае с IL-1 β , наблюдалась тенденция к увеличению иммуногистохимической реакции на маркер у животных в возрасте 8–10 недель.

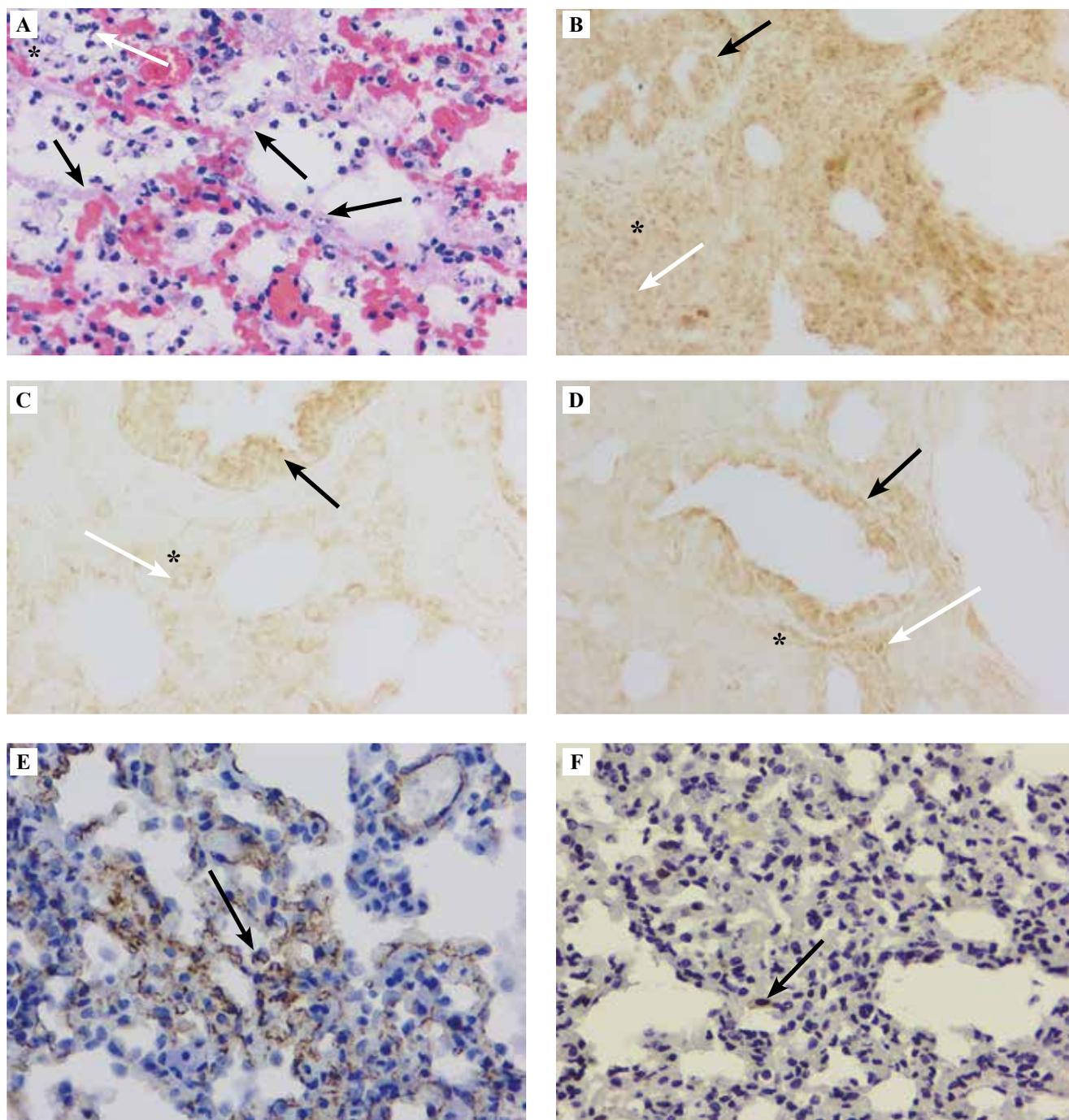


Рис. 1. Репрезентативные изображения результатов гистологического (А) и иммуногистохимического (В–F) исследований. А – гиалиновые мембраны, выстилающие альвеолы (черные стрелки), нейтрофилы в просвете альвеол и инфильтрирующие паренхиму легкого (белая стрелка), отек (звездочка). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. В, С, D – положительное окрашивание эпителиальных клеток (черные стрелки), иммунных клеток (белые стрелки) и положительное окрашивание межклеточного вещества (звездочки). ИГХ исследование с антителами IL-1 β (В), IL-6 (С), TNF- α (D), $\times 200$. E – положительное окрашивание эндотелиоцитов (стрелка). ИГХ исследование с антителами CD31 и докрасивание гематоксилином, $\times 400$. F – положительное окрашивание ядер (стрелка). ИГХ исследование с антителами Ki-67, докрасивание гематоксилином, $\times 400$

Fig. 1. The results of histological (A) and immunohistochemical (B–F) assays.

A – hyaline membranes lining the alveoli (black arrows), neutrophils located in the alveolar lumen and infiltrating the lung parenchyma (white arrow), edema (asterisk). H&E stain, $\times 400$. B, C, D – positive staining of epithelial cells (black arrows), immune cells (white arrows), the intercellular substance (asterisks). IHC assay with antibodies to IL-1 β (B), IL-6 (C), TNF- α (D), $\times 200$. E – positive staining of endothelial cells (arrow). IHC assay with antibodies to CD31 and additional hematoxylin stain, $\times 400$. F – positive staining of nuclei (arrow). IHC assay with antibodies to Ki-67 and additional hematoxylin stain, $\times 400$

Таблица 2 | Table 2

Результаты исследования количества бокаловидных клеток через 72 часа после моделирования патологии |
Results of studying the number of goblet cells 72 hours after modeling the pathology

Изучаемый параметр Studied parameter	Группа 1 Group 1	Группа 3 Group 3	Группа 2 Group 2	Группа 4 Group 4
	4–6 недель, контроль 4–6 weeks, control	4–6 недель, ОРДС 4–6 weeks, ARDS	8–10 недель, контроль 8–10 weeks, control	8–10 недель, ОРДС 8–10 weeks, ARDS
Масса животных, г Animals' weight, g M±SEM	148±2		259±3	
Число измерений, n Measurement number, n	10	10	10	10
Бокаловидные клетки, штук на 500 мкм, ^A Goblet cells, unit per 500 μm, ^A M±SEM	4,7±0,56	38,9±4,68 ^B	5,5±1,19	43,7±5,12 ^C

1 ^A – данные соответствовали закону нормального распределения. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил влияние фактора «группа» на показатель «Бокаловидные клетки» ($p < 0,05$; примечания 2 и 3);

2 ^B – статистически значимые отличия группы 3, получившей ЛПС в дозе 15 мг/кг, в сравнении с группой 1 (критерий Тьюки, $p = 0,00016$);

3 ^C – статистически значимые отличия группы 4, получившей ЛПС в дозе 15 мг/кг, в сравнении с группой 2 (критерий Тьюки, $p = 0,00016$)

1. ^A – The data conformed to the normal distribution law. One-way analysis of variance (ANOVA) revealed the influence of the factor “group” on the indicator “Goblet cells” ($p < 0.05$; see notes 2 and 3);

2. ^B – Statistically significant differences in group 3, which received LPS at a dose of 15 mg/kg, compared to group 1 (Tukey’s test, $p = 0.00016$);

3. ^C – Statistically significant differences in group 4, which received LPS at a dose of 15 mg/kg, compared to group 2 (Tukey’s test, $p = 0.00016$)

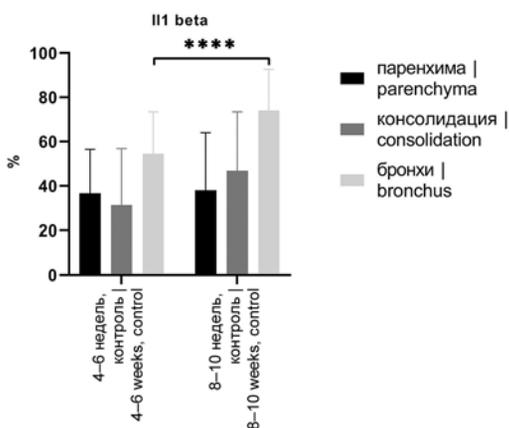


Рис. 2. Уровни иммуногистохимической экспрессии IL-1 β в группах контроля разного возраста

% – площадь положительно окрашенной ткани, выраженная в процентах от общей площади ткани в срезе. Данные представлены в виде Me (IQR); **** – критерий Манна–Уитни, $p = 0,000084$

Fig. 2. Immunohistochemical expression levels of IL-1 β in the control groups of different ages

% – the area of positively stained tissue as a percentage of the total tissue area in the section. Data is presented as Me (IQR); **** – Mann–Whitney test, $p = 0.000084$

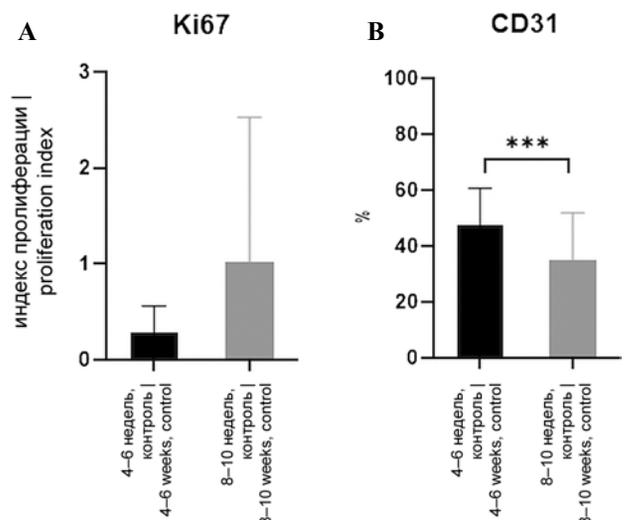


Рис. 3. Уровни иммуногистохимической экспрессии Ki-67 (A) и CD31 (B) в группах контроля разного возраста

% – площадь положительно окрашенной ткани, выраженная в процентах от общей площади ткани в срезе. Данные представлены в виде Me (IQR); *** – критерий Манна–Уитни, $p = 0,0006$

Fig. 3. Immunohistochemical expression levels of Ki-67 (A) and CD31 (B) in the control groups of different ages

% – the area of positively stained tissue as a percentage of the total tissue area in the section. Data is presented as Me (IQR); *** – Mann–Whitney test, $p = 0.0006$

В группе со сформированным ОРДС у животных в возрасте 4–6 недель (группа 3) наблюдали увеличение уровня IL-1 β во всех исследуемых областях (рис. 4) относительно группы контроля этого же возраста. Повышение уровня цитокина в слизистой оболочке бронхов и области консолидации паренхимы легких было статистически значимым. У животных в возрасте 8–10 недель повышение выраженности иммуногистохимической реакции на IL-1 β при моделировании патологии наблюдали только в области неизменной паренхимы.

Относительная плотность капиллярной сети легких снизилась в группе с моделированием патологии в возрасте 4–6 недель (рис. 5 А). При этом у групп в возрасте 8–10 недель моделирование патологии не оказало значимого влияния (рис. 5 А). Индекс пролиферации имел тенденцию к возрастанию в группах с моделированием патологии, однако статистически значимые различия обнаружены не были (рис. 5 В).

Обсуждение

Результаты гистологического исследования, приведенные выше, позволяют сделать вывод об успешном моделировании патологии и о возможности интерпретировать данные иммуногистохимического окрашивания в контексте влияния на него моделирования ОРДС.

Контрольная группа крыс в возрасте 8–10 недель демонстрировала более высокие базальные уровни иммуногистохимической реакции на воспалительные маркеры IL-1 β и TNF- α , а также пролиферативной активности, чем животные в возрасте 4–6 недель.

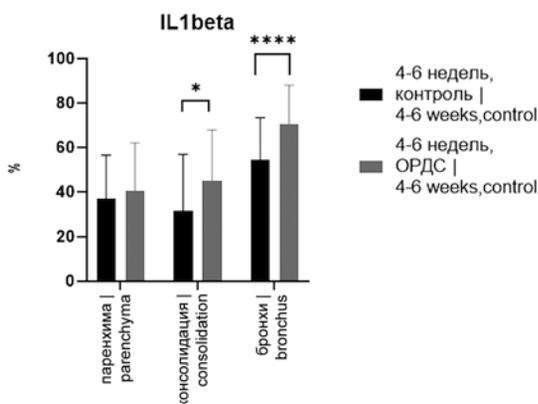


Рис. 4. Уровни иммуногистохимической экспрессии IL-1 β % – площадь положительно окрашенной ткани, выраженная в процентах от общей площади ткани в срезе. Данные представлены в виде Me (IQR); * – критерий Манна–Уитни, $p=0,0320$; *** – критерий Манна–Уитни, $p<0,001$

Fig. 4. Immunohistochemical expression levels of IL-1 β % – the area of positively stained tissue as a percentage of the total tissue area in the section. Data is presented as Me (IQR); * – Mann–Whitney test, $p=0.0320$; *** – Mann–Whitney test, $p<0.001$

Относительная площадь сосудистой сети легких, напротив, снижалась с возрастом. Уровень воспалительных цитокинов ни в одной из исследуемых областей обеих контрольных групп не был абсолютно нулевым. Эти данные следует учитывать при планировании исследований ОРДС и анализе результатов.

В предыдущих работах, посвященных ОРДС, при измерении концентраций TNF- α и IL-1 β в бронхоальвеолярном лаваже человека методом иммуноферментного анализа авторы отмечали их повышение в первый день после установления факта развития патологии [5, 11]. Тем не менее в исследовании на мышах [12], в котором концентрация TNF- α и IL-1 β измерялась в гомогенате легких методом полимеразной цепной реакции, изменение концентрации этих цитокинов не обнаружено.

В настоящей работе отмечено повышение уровней IL-1 β при моделировании патологии, что согласуется с данными, полученными у человека. При этом животные в возрасте 4–6 недель показали большую чувствительность к влиянию моделирования патологии на уровень иммуногистохимической реакции на IL-1 β . Вероятно, это связано с более низкими базальными

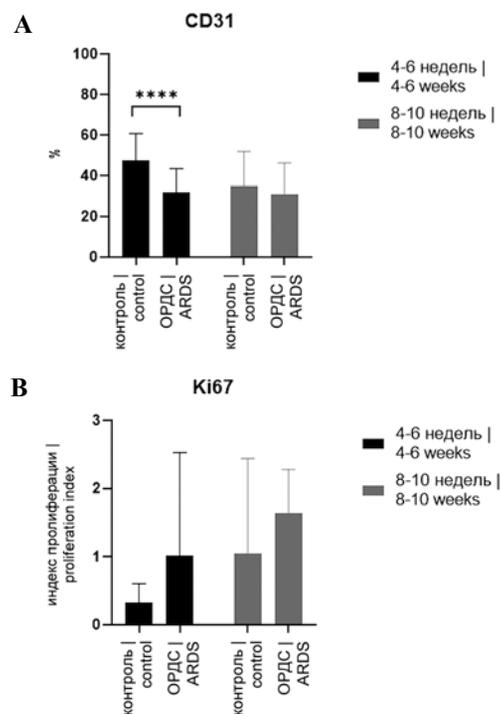


Рис. 5. Уровни иммуногистохимической экспрессии CD31 (А) и Ki-67 (В) % – площадь положительно окрашенной ткани, выраженная в процентах от общей площади ткани в срезе. Данные представлены в виде Me (IQR); **** – критерий Манна–Уитни, $p<0,00001$

Fig. 5. Immunohistochemical expression levels of CD31 (A) and Ki-67 (B) % – the area of positively stained tissue as a percentage of the total tissue area in the section. Data is presented as Me (IQR); **** – Mann–Whitney test, $p<0.00001$

уровнями данного цитокина по сравнению со старшей возрастной группой. Согласно полученным нами данным, наиболее показательными для исследования являются область консолидации и слизистая оболочка бронхов.

Опираясь на результаты, полученные по уровню TNF α , мы не можем рекомендовать этот цитокин как иммуногистохимический маркер выраженности ОРДС, индуцируемого липополисахаридом. Значимые изменения концентрации цитокина обнаружены не были.

Животные в возрасте 4–6 недель оказались также более чувствительны к влиянию моделирования патологии на эндотелий сосудов. В данной возрастной группе площадь положительной на CD31 области значительно снижалась у животных со сформированным ОРДС. Полученные результаты демонстрируют снижение относительной плотности капиллярной сети в образцах с формированием патологии, что в контексте нашего исследования может свидетельствовать о сосудистом повреждении.

Кроме того, достоверные различия не обнаружены при исследовании пролиферативной активности в тканях легких. Это может быть связано с тем, что для оценки изменения этого показателя использованы случайные области легких. Также это может быть связано с преобладанием на этой стадии ОРДС альтернативных процессов над пролиферативными. Ki-67 будет потенциально показательным на более поздних стадиях развития патологии как один из маркеров репаративных процессов и фиброза. Ожидается, что изменения индекса пролиферации будут наблюдаться при исследовании альвеолоцитов и миофибробластов, что послужит потенциальным маркером выраженности пролиферативной стадии.

Заключение

Ориентируясь на результаты данного исследования, мы можем рекомендовать в качестве иммуногистохимических маркеров выраженности острого респираторного дистресс-синдрома на 4-й день развития патологии IL-1 β как воспалительный цитокин и CD31 как эндотелиальный маркер. Возраст животных 4–6 недель по результатам этого исследования показал более стабильные результаты в изменении маркеров и, на наш взгляд, является предпочтительным. Стоит отметить, что при планировании исследования с моделированием острого респираторного дистресс-синдрома необходимо учитывать временную точку забора легких для исследования. Полученные данные могут оказаться неактуальными для более ранних или поздних сроков течения патологии. Также при планировании исследования иммуногистохимической реакции на IL-1 β следует обратить внимание на выбор исследуемых областей и отдавать предпочтение области паренхимы на периферии очага консолидации и слизистой оболочке бронхов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.А. Сапрыкина, М.Н. Макарова.

Сбор и обработка материала – Ж.Ю. Устенко, А.И. Савватейкина, Я.А. Гушчин, А.А. Сапрыкина.

Написание текста – Ж.Ю. Устенко, А.И. Савватейкина.

Редактирование – М.Н. Макарова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.A. Saprykina, M.N. Makarova.

Collected the data and performed the analysis – Zh.Yu. Ustenko, A.I. Savvateikina, Ya.A. Gushchin, A.A. Saprykina.

Wrote the paper – Zh.Yu. Ustenko, A.I. Savvateikina.

Edited the manuscript – M.N. Makarova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Яцков И.А., Белоглазов В.А., Ряпова Э.И. Липополисахарид и ОРДС, вызванный новой коронавирусной инфекцией: гипотезы и факты. Медицинская иммунология. 2022;24(1):7–18. DOI: 10.15789/1563-0625-LAA-2229.
Yatskov IA, Beloglazov VA, Ryapova EI. Lipopolysaccharide and ARDS caused by new coronavirus infection: hypotheses and facts. Medical Immunology = Meditsinskaya Immunologiya. 2022;24(1):7–18 (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-LAA-2229.
2. Чепур С.В., Тюнин М.А., Мясников В.А., Алексеева И.И., Владимиров О.О., Ильинский Н.С. и др. Поражение органов и тканей SARS-CoV-2: биологическая модель на сирийских хомьяках *Mesocricetus auratus* для экспериментальных (доклинических) исследований. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(4):25–34. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34.
Chepur SV, Tyunin MA, Myasnikov VA, Alekseeva II, Vladimirova OV, Ilinskiy NS et al. Organ and tissue damage related to SARS-CoV-2: the biological model for experimental (preclinical) trials on golden hamsters *Mesocricetus auratus*. Clinical and experimental morphology. 2021;10(4):25–34 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34.
3. Garth J, Barnes JW, Krick S. Targeting cytokines as evolving treatment strategies in chronic inflammatory airway diseases. Int J Mol Sci. 2018;19(11):3402. DOI: 10.3390/ijms19113402.
4. Burnham EL, Janssen WJ, Riches DW, Moss M, Downey GP. The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. Eur Respir J. 2014;43(1):276–85. DOI: 10.1183/09031936.00196412.
5. Bhargava M, Wendt CH. Biomarkers in acute lung injury. Transl Res. 2012;159(4):205–17. DOI: 10.1016/j.trsl.2012.01.007.
6. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(10):a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
7. Blondonnet R, Constantin JM, Sapin V, Jabaudon MA. Pathophysiologic approach to biomarkers in acute respiratory distress syndrome. Dis Markers. 2016;2016:3501373. DOI: 10.1155/2016/3501373.
8. Kadam AH, Schnitzer JE. Characterization of acute lung injury in the bleomycin rat model. Physiol Rep. 2023;11(5):e15618. DOI: 10.14814/phy2.15618.

9. Пугач В.А., Тюнин М.А., Власов Т.Д., Ильинский Н.С., Гоголевский А.С., Чепур С.В. Биомаркеры острого респираторного дистресс-синдрома: проблемы и перспективы их применения. Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2019;4:38–46. DOI: 10.21292/2078-5658-2019-16-4-38-46.
Pugach VA, Tyunin MA, Vlasov TD, Ilinskiy NS, Gogolevskiy AS, Chepur SV. Biomarkers of acute respiratory distress syndrome: problems and prospects of their application. Messenger of anesthesiology and resuscitation = Vestnik anesteziologii i reanimatologii. 2019;16(4):38–46 (In Russ.). DOI: 10.21292/2078-5658-2019-16-4-38-46.
10. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? J Pharmacol Pharmacother. 2013;4(4):303–6. DOI: 10.4103/0976-500X.119726.
11. Zeng Z, Yu H, Chen H, Qi W, Chen L, Chen G et al. Longitudinal changes of inflammatory parameters and their correlation with disease severity and outcomes in patients with COVID-19 from Wuhan, China. Crit Care. 2020;24(1):525. DOI: 10.1186/s13054-020-03255-0.
12. Помяткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. Биомедицина. 2020;16(4):24–33. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33.
Pomytkin IA, Karkischenko VN., Fokin YuV, Nesterov MS, Petrova NV. A model of fatal acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Journal Biomed. 2020;16(4):24–33 (In Russ.). DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33.

Информация об авторах

Жанна Юрьевна Устенко – кандидат ветеринарных наук, заместитель руководителя отдела гистологии и патоморфологии НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Анастасия Игоревна Савватейкина – врач-патоморфолог отдела гистологии и патоморфологии НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Анастасия Александровна Сапрыкина – младший научный сотрудник НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Ярослав Александрович Гущин – руководитель отдела гистологии и патоморфологии НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Марина Николаевна Макарова – доктор медицинских наук, директор НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Author information

Zhanna Yu. Ustenko – Cand. Sci. (Vet.), Deputy Head of the Department of Histology and Pathomorphology, RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0003-1299-0200>

Anastasiya I. Savvateikina – Pathologist, Department of Histology and Pathomorphology, RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0002-5039-885X>

Anastasiya A. Saprykina – Junior Researcher, RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0002-7588-3982>

Yaroslav A. Gushchin – Head of the Department of Histology and Pathomorphology, RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0002-7656-991X>

Marina N. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Director of the RMC “HOME OF PHARMACY” JSC.

<https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>