

УДК 616 – 74/078 + 616.24 – 002+577.152.34

© Коллектив авторов, 2012.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ПРОТЕОЛИЗА И ТЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ ЛЕГКИХ

В.В. Щербак, А.В. Кубышкин, Т.Г. Филоненко, Л.Л. Алиев

*Кафедра патологической физиологии (зав. кафедрой – д.м.н., профессор Кубышкин А.В.)
ДУ «Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського», м. Сімферополь*

CHANGING OF THE PROTEOLYSIS PROCESSES AND EXPERIMENTAL PNEUMONIA'S CURRENT AT PHARMACOLOGICAL MODIFICATION OF INFLAMMATION

V.V. Scherbak, A.V. Kubyshkin, T.G. Filonenko, L.L. Aliev

SUMMARY

A comparative analysis of morphological changes and proteolysis parameters in blood serum and bronchoalveolar lavage in the development of experimental pneumonia and background of the pharmacological modification of pneumonia were studied. Injections of Bicillinum-3, Rheopyrin and Nandrolone similar changes in the blood serum were observed, manifested by increased elastase-like activity with low fluctuations of inhibitors capacity. Morphological changes and proteolysis parameters at the local level depended on the mechanism of used pharmacological agents. The best effect with a reduction of morphological manifestations of inflammation and proteolytic activity was observed in the correction by Bicillinum-3. The most unfavorable effect with development of fibrotic changes in lung tissue and increase of elastase-like activity of proteases was in Nandrolone administration.

ЗМІНА ПРОЦЕСІВ ПРОТЕОЛІЗУ ТА ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПНЕВМОНІЇ ПРИ ФАРМАКОЛОГІЧНІЙ МОДИФІКАЦІЇ ЗАПАЛЕННЯ ЛЕГЕНІВ

В.В. Щербак, А.В. Кубишкін, Т.Г. Філоненко, Л.Л. Алієв

РЕЗЮМЕ

У статті проведено порівняльний аналіз морфологічних змін і показників процесів протеолізу в сироватці крові і бронхоальвеолярному змиві при розвитку експериментальної пневмонії і на тлі фармакологічної модифікації запалення легень. У сироватці крові при застосуванні біциліна-3, реопірина і нероболіла спостерігалися схожі зміни, які проявлялися підвищенням еластазоподібної активності на тлі незначних коливань інгібіторного потенціалу. Морфологічні зміни і показники процесів протеолізу на місцевому рівні залежали від механізму дії застосовуваного фармакологічного засобу. Найкращий ефект із зменшенням морфологічних проявів запалення і протеолітичної активності спостерігався при корекції біциліном-3, а найбільш несприятливий з розвитком фіброзних змін в легеневій тканині та значним збільшенням активності еластазоподібних протеїназ при застосуванні нероболіла.

Ключевые слова: воспаление, легкие, протеиназы, ингибиторы протеиназ, фармакологическая коррекция.

Изучение механизмов формирования воспалительной реакции показывает, что в патогенезе воспаления участвует большое количество взаимосвязанных факторов [1,2]. Биологически-активные вещества, цитокины, регулирующие и эффекторные молекулы способны влиять на течение воспалительного процесса и потенцировать межклеточные взаимодействия [3,4,5]. В связи с этим особый интерес привлекает исследование эффектов различных фармакологических препаратов, способных модифицировать течение воспалительной реакции и влиять на реакции систем, участвующих в ее развитии.

Особое внимание привлекает изучение механизмов модификации бронхолегочного воспаления, что связано с частым развитием деструктивных процессов в легких и установленной важной ролью неспе-

цифических протеиназ в их развитии [6,7,8]. Несмотря на то, что роль дисбаланса протеиназ-ингибиторной системы в развитии бронхолегочной патологии известна давно, препараты для ее целевой коррекции при патологии легких до настоящего времени не разработаны и состояние протеиназ не учитывается при проведении фармакотерапии бронхолегочного воспаления препаратами других групп [9].

Цель исследования – изучить особенности течения экспериментальной пневмонии и изменение параметров протеиназ-ингибиторной системы при фармакологической модификации воспаления легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводились на 45 белых крысах-самцах линии «Вистар». Живот-

ным всех групп проводили моделирование повреждения легких путем введения стерильной капроновой нити диаметром 0,2 мм и длиной 3,5 см в трахею животных. Для изучения фармакологической модификации воспалительного процесса использовали бициллин-3, антибактериальный препарат широкого спектра действия; реопирин, нестероидное противовоспалительное средство, реализующее свои эффекты путем подавления синтеза простагландинов; нероболл, стероидный препарат с анаболическим эффектом, активирующий репаративные процессы за счет стимуляции биосинтеза белка и структурных компонентов клеток. Коррекцию препаратами начинали через 2 недели после введения нити и проводили в течение 14 дней. Крысам первой группы (n=9) вводился бициллин-3 (БЛ) из расчета 500 Е/100 г массы тела крысы в/м через 3 дня в течение 2 недель 4 инъекции на курс; крысам второй группы (n=9) применялся реопирин (РП), который разводили в 4 раза дистиллированной водой и вводили по 0,1 мл в/м через день 7 инъекций на курс; крысам третьей группы (n=9) вводился нероболл (НБ) по 0,2 мл, предварительно растворенного в 4,8 мл стерильного оливкового масла по 0,1 мл (0,1 мг) 1 раз в неделю всего 2 инъекции внутримышечно. Сравнение результатов, полученных в первых трех группах экспериментальных животных, проводили с отдельной группой крыс (n=10), у которых экспериментальная пневмония развивалась в течение 1 месяца. Контрольную группу составляло 10 здоровых животных. Крысы выводились из эксперимента в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследованиях и других научных целях» (Strasburg, 1986). После умерщвления животных под эфирным наркозом произво-

дили забор крови из яремной вены и получали бронхоальвеолярный смыв (БАС) путем промывания легких через трахею 10 мл физиологического раствора.

Для оценки патоморфологических изменений в ткани легких готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином, эозином и пикрофуксином по Ван Гизону, соединительнотканые волокна окрашивались в красный цвет. Просмотр и цифровые фотографии микропрепаратов осуществляли с помощью светового микроскопа «Olympus CX-41».

В сыворотке крови и бронхоальвеолярном смыве изучали активность протеиназ и их ингибиторов исследовали с использованием энзиматических методов [10] с измерением на спектрофотометре «BioMate 5» (Великобритания). Эластазоподобную активность (ЭПА) определяли по скорости ферментативного гидролиза синтетического субстрата N-т-бок-L-аланил-п-нитрофенилового эфира (БАНФЭ), трипсиноподобную активность (ТПА) по скорости отщепления бензоил-аргинина от N- α -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ), а-1 ингибитор протеиназ (а-1-ИП), антитриптическую активность (АТА) и кислотостабильные ингибиторы (КСИ) по торможению биологическим материалом ферментативного гидролиза трипсином БАЭЭ.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M) и оценкой средней ошибки (m), достоверными считали результаты при $p < 0,05$ с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение патоморфологических изменений в легочной ткани при развитии экспериментальной

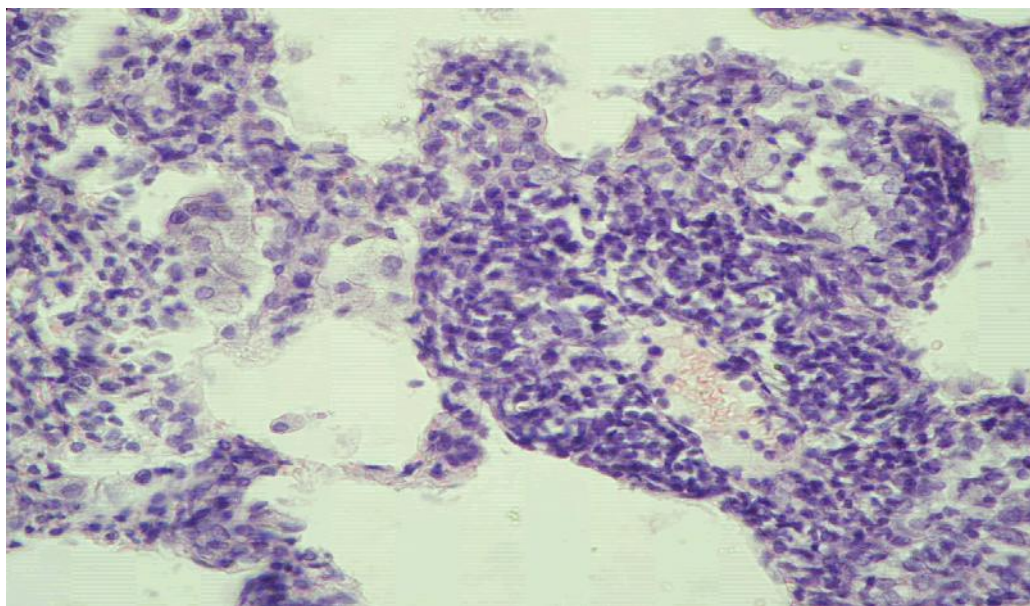


Рис. 1. Легкое крысы с воспалением сроком 1 месяц. Лимфоидное скопление вокруг веточки легочной артерии. Мелкие внутриальвеолярные скопления макрофагов. Гематоксилин-эозин. Ув. x 400.

пневмонии показало, что через месяц после начала действия этиологического фактора в легких отмечалось полнокровие сосудов легких, утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека, слабо выраженного склероза, полнокровия капилляров.

Кроме этого, обнаруживались эмфизематозные участки, в просветах бронхиального дерева были видны конгломераты десквамированного эпителия, а также наблюдались внутриальвеолярно расположенные скопления макрофагов, вокруг легочных артерий выявлялось увеличенное количество лимфоцитов, кото-

рые формируют скопления в виде «муфт» (рис.1).

Проведение модификации острой экспериментальной пневмонии с фармакологической коррекцией показало, что наиболее благоприятный эффект был отмечен при коррекции антибактериальным препаратом. Так, при действии бициллина-3 уменьшалась клеточная инфильтрация, были менее выражены деструкция и гиперемия стенок бронхов, происходило снижение проявлений эмфиземы и уменьшение площади легочной паренхимы, находящейся в состоянии дистелектаза, макрофагальная реакция была выражена слабее (рис.2).

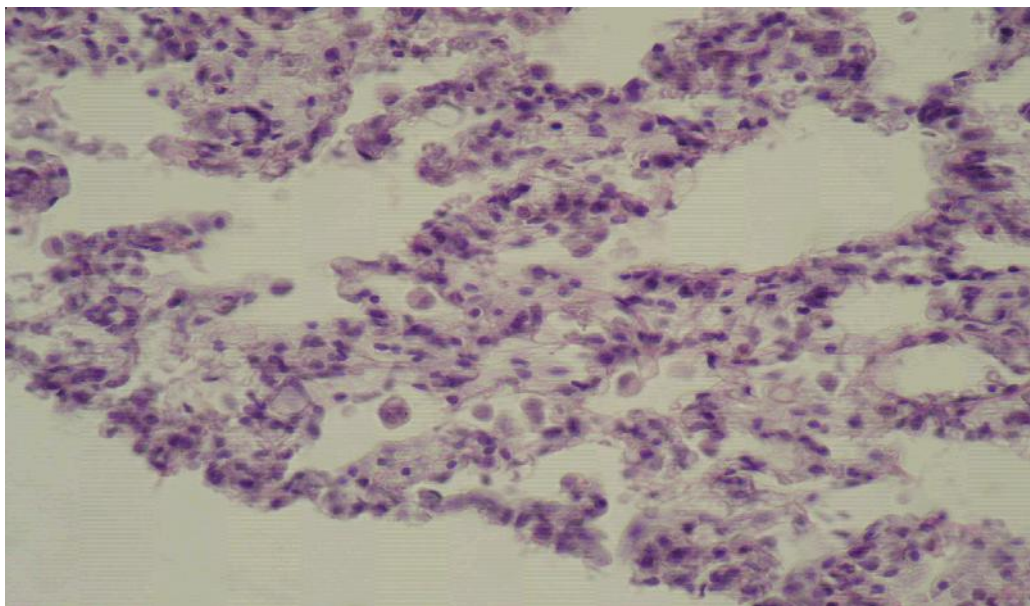


Рис.2. Легкое крысы с воспалением сроком 1 месяц и модификацией бициллином-3. Слабая макрофагальная реакция. Гематоксилин-эозин. Ув. x 400.

При модификации с помощью реопирин сохранялась лимфо-гистиоцитарная инфильтрация ме-

жальвеолярных перегородок вне зон эмфизематозных изменений (рис.3), однако количество сегмен-

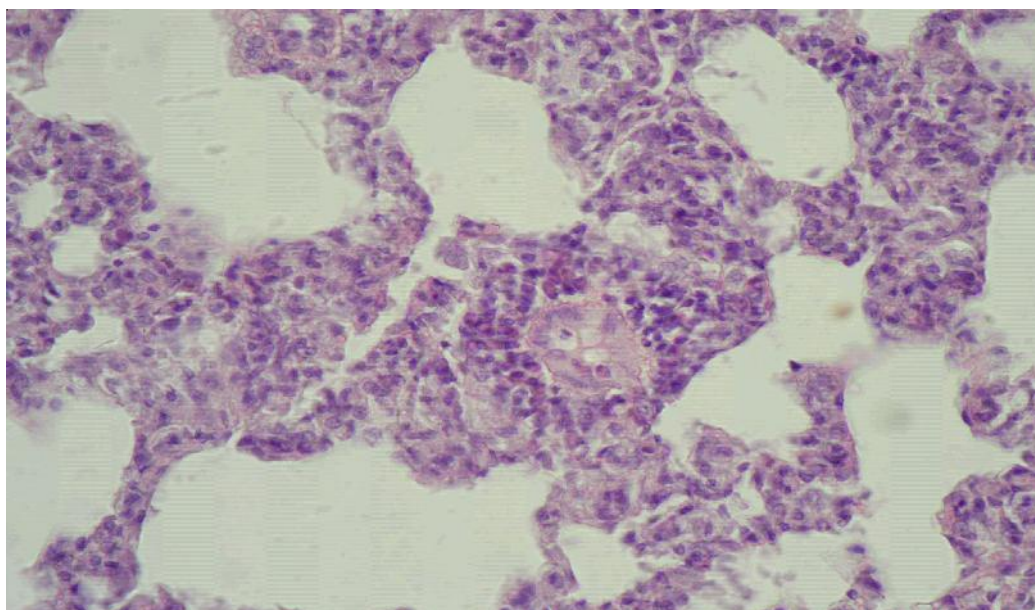


Рис.3. Легкое крысы с воспалением сроком 1 месяц и модификацией реопирином. Утолщение межальвеолярных перегородок вне зон эмфизематозных изменений. Гематоксилин-эозин. Ув. x 400.

тоядерных лейкоцитов уменьшалось, располагались они периваскулярно и в межальвеолярных перегородках, полнокровие и отек которых были хорошо выражены.

При применении нероболила выявлялись участки эмфизематозных изменений в субплевральных

зонах и, частично, в центральной, а между ними располагалась легочная ткань с утолщенными межальвеолярными перегородками, выраженными за счет сохраняющегося отека и полнокровия, наблюдались проявления фиброза (рис.4).

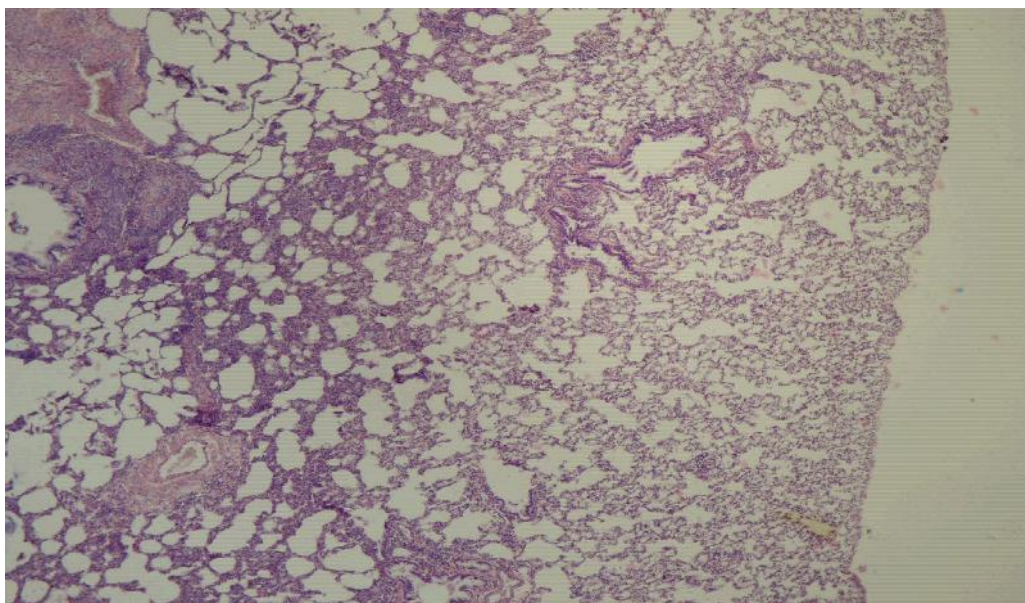


Рис.4. Легкое крысы с воспалением сроком 1 месяц и модификацией нероболилом. Чередование зон дисталектаза и эмфиземы. Гематоксилин-эозин. Ув. х 400.

Выявленные морфологические изменения сопровождались характерными сдвигами показателей неспецифических протеиназ и их ингибиторов. В сыворотке крови через месяц развития экспериментальной пневмонии выявлялось уменьшение уровня

ЭПА в 2 раза, увеличением ТПА в 2 раза и ростом ингибиторного потенциала, проявляющегося тенденцией к увеличению α -1-ИП, а также достоверным увеличением уровня кислотостабильных ингибиторов на 37,8% и α -2-мг в 2,5 раза (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние фармакологической модификации на состояние показателей протеолиза в сыворотке крови крыс с острой экспериментальной пневмонией

	n	Показатели	ЭПА мкМ/мл*мин	ТПА мкМ/мл*мин	α -1-ИП ИЕ/мл	КСИ ИЕ/мл
Контроль (здоровые)	10	$M \pm m$	2,47+0,09	0,23+0,04	27,9+4,37	6,84+1,08
Воспаление 1 мес	8	$M \pm m$	1,25+0,08	0,43+0,03	35,8+2,5	9,43+0,96
		p_1	<0,001	<0,001	>0,25	>0,1
Воспаление + БЛ	9	$M \pm m$	1,83+0,15	0,33+0,04	37,1+1,83	7,65+1,57
		p_1	<0,001	>0,1	<0,05	>0,5
		p_2	<0,001	<0,05	>0,5	>0,5
Воспаление + РП	9	$M \pm m$	2,26+0,21	0,21+0,02	37,3+1,12	8,5+0,31
		p_1	>0,5	>0,5	<0,05	>0,25
		p_2	<0,001	<0,001	>0,5	>0,5
Воспаление + НБ	9	$M \pm m$	2,07+0,11	0,68+0,07	43,2+7,77	8,67+0,83
		p_1	<0,001	<0,001	>0,1	>0,25
		p_2	<0,001	<0,001	>0,5	>0,5

Примечание: p_1 – показатель достоверности по отношению к контролю, p_2 – показатель достоверности сравнения месячным воспалением

Состояние показателей системы протеолиза в бронхоальвеолярном смыве при развитии месячного воспаления характеризовалось усилением протео-

литической активности на фоне роста ингибиторов протеиназ, уровень ТПА увеличивался в 10 раз, а АТА почти в 3 раза (табл. 2).

Таблица 2

Влияние фармакологической модификации на состояние показателей протеолиза в БАС крыс с острой экспериментальной пневмонией

	n	Показатели	ЭПА мкМ/мл*мин	ТПА мкМ/мл*мин	АТА мИЕ/мг	КСИ ИЕ/мл
Контроль (здоровые)	10	M±m	7,65±1,77	1,21±0,36	25,5±4,1	15,1±6,46
Воспаление 1 мес	8	M±m	8,52±0,43	13,0±1,78	69,9±19,9	33,2±5,88
		p ₁	>0,5	<0,001	<0,01	<0,05
Воспаление + БЛ	9	M±m	1,85±0,64	5,71±0,33	136,2±87,4	10,2±7,66
		p ₁	<0,01	<0,001	>0,25	>0,5
		p ₂	<0,001	<0,001	>0,5	<0,01
Воспаление + РП	9	M±m	10,9±6,36	16,8±0,34	73,1±8,04	36,8±20,5
		p ₁	>0,5	<0,001	<0,001	>0,5
		p ₂	>0,5	<0,05	>0,5	>0,5
Воспаление + НБ	9	M±m	45,2±4,51	23,4±9,91	169,4±53,1	60,3±32,2
		p ₁	<0,001	<0,05	<0,01	>0,25
		p ₂	<0,001	>0,5	>0,1	>0,5

Примечание: p₁ – показатель достоверности по отношению к контролю, p₂ – показатель достоверности сравнения месячным воспалением

После проведения курса коррекции бициллином-3 в сыворотке крови по сравнению с группой без лечения происходило увеличение эластазоподобной активности на 46,4 % и снижение трипсиноподобной активности на 30,3 %, что сочеталось с тенденциями к повышению а-1-ИП и понижению кислотостабильных ингибиторов. После коррекции реопирином наблюдались аналогичные сдвиги параметров протеиназ-ингибиторной системы с более выраженным изменением активности протеиназ: ЭПА увеличивалась на 80,8 %, а ТПА уменьшалась в 2 раза. Использование нероболила характеризовалось ростом протеолитической активности эластазы на 65,6 % и ТПА на 58,1 % при схожей тенденции к повышению уровня а-1-ИП и снижению КСИ.

Изменения параметров протеиназ и их ингибиторов в бронхоальвеолярном смыве при сравнении с группой без фармакологической модификации были более существенными, чем в сыворотке крови. При коррекции бициллином-3 отмечалось значительное снижение протеолитической активности эластазы в 4,5 раза, а трипсиноподобных протеиназ более чем в 2 раза; уровень кислотостабильных ингибиторов при этом уменьшался в 3 раза, а АТА имела тенденцию к повышению. При коррекции реопирином наблюдались минимальные изменения протео-

литической активности с достоверным увеличением трипсиноподобной активности на 29,2 % и тенденцией к повышению эластазоподобной активности. На фоне этого выявлялась лишь тенденция к повышению уровня ингибиторов протеиназ. Модификация течения воспаления нероболилом приводила, напротив, к выраженному увеличению ЭПА более чем в 5 раз, а также тенденцией к повышению ТПА, АТА и КСИ.

Таким образом, в целом при модификации течения воспаления фармакологическими препаратами, влияющими на развитие воспалительной реакции, состояние протеиназ-ингибиторной системы и патоморфологические изменения характеризовались разнообразными изменениями, причем выявленные сдвиги можно трактовать как с точки зрения положительных, так и отрицательных эффектов. Максимальная нормализация структуры ткани легких и оптимальные параметры сдвигов протеиназ-ингибиторной системы наблюдались при применении бициллина-3, что, по-видимому, связано с антибактериальным механизмом действия препарата. Уменьшение бактериального обсеменения в легких приводило к уменьшению эмиграции лейкоцитов в очаг воспаления и способствовало снижению протеолитической активности. При модификации течения вос-

паления реопирином некоторое уменьшение морфологических признаков воспаления в легких сопровождалось умеренным ростом как протеолитической активности, так и ингибиторов протеиназ. Наиболее негативные изменения параметров наблюдались при применении нероболила, который на фоне продолжающегося воспаления, по-видимому, стимулировал репаративные процессы в легких, что могло приводить к усилению альтерации за счет значительного увеличения эластазоподобной активности, которая не уменьшалась даже на фоне некоторого роста ингибиторов протеиназ.

ВЫВОДЫ

1. Фармакологическая модификация воспаления легких антибактериальным препаратом бициллин-3 проявлялась уменьшением морфологических проявлений воспаления и снижением протеолитической активности в бронхоальвеолярном секрете.

2. Коррекция течения воспаления легких реопирином характеризовалась минимальными морфологическими изменениями, которые слабо отличались от проявлений по сравнению с острым воспалением без коррекции, что сопровождалось умеренным ростом ТПА на фоне тенденции к увеличению ингибиторов.

3. Модификация экспериментальной пневмонии нероболилом приводила к усилению морфологических признаков воспаления легких с появлением фиброзных изменений в легочной ткани и значительному повышению в бронхоальвеолярном секрете активности эластазоподобных протеиназ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cornwell W.D., Kim V., Song C., Rogers T.J. Pathogenesis of inflammation and repair in advanced COPD // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – V. 31. – P. 257-266.

2. Fischer B.M., Pavlisko E., Voynow J.A.

Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2011. – V. 6. – P. 413-421.

3. Cao J., Ren G., Gong Y. Bronchial epithelial cells release IL-6, CXCL1 and CXCL8 upon mast cell interaction // *Cytokine.* – 2011. – oct. 21.

4. Wong C.K., Tsang C.M., Ip WK, Lam C.W. Molecular mechanisms for the release of chemokines from human leukemic mast cell line (HMC)-1 cells activated by SCF and TNF-alpha: roles of ERK, p38 MAPK, and NF-kappaB // *Allergy.* – 2006. – V. 61. – P. 289-297.

5. Wong C.K., Cao J., Yin Y.B., Lam C.W. Interleukin-17A activation on bronchial epithelium and basophils: a novel inflammatory mechanism // *Eur. Respir. J.* – 2010. – V. 35. – P. 883-893.

6. Abboud R.T., Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2008. – V. 12. – P. 361-367.

7. Hu J., Van Den Steen P. E., Sang Q. X. et al. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2007. – V. 6. – P. 480-498.

8. Hollander C., Westin U., Wallmark A. et al. Plasma levels of alpha 1-antichymotrypsin and secretory leukocyte proteinase inhibitor in healthy and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subjects with and without severe alpha 1-antitrypsin deficiency // *BMC Pulm. Med.* – 2007. – V. 7. – P. 154-159.

9. Neurohr C, Behr J. Diagnosis and therapy of interstitial lung diseases. *Dtsch. Med. Wochenschr.* – 2009. – V. 134. – P. 524-529.

10. Кубишкін А.В., Харченко В.З., Семенець П.Ф. та ін. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах. (Методичні рекомендації). Київ, 2010.