

УДК 616.24-002:612.24-005.98

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  $\chi^2$ , 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 IκB от протеаз. Дополнительное введение шаперона снижает экспрессию транскрипционного фактора NF-κB, 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).