

**ЗАЩИТА ОТ РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА ПРИ
ИНГАЛЯЦИОННОМ ОТРАВЛЕНИИ ПУЛЬМОНОТОКСИКАНТАМИ**

Земляной А.В.¹, Оникиенко С.Б.², Вивуланец Е.В.¹, Варлашова М.Б.¹, Торкунов П.А.³,
Бородавко В.К.⁴

¹ ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии
человека» ФМБА России, 18663, Ленинградская область, Всеволожский район,

г.п. Кузьмолровский, Российская Федерация

Т/факс (812) 449-61-77; (812) 449-61-68; (812) 606-62-80; (812) 606-62-83;

e-mail: grech@fmbamail.ru; niigrech@rihophe.ru

² ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ

194044, Санкт-Петербург, ул. Лебедева, 6

Тел. 8 (812) 292-32-01; e-mail: vtmz@vmeda.org

³ Псковский государственный университет, 180000, Псков, пл. Ленина, 2.

Тел.: +7(8112) 29-70-01, Факс: +7(8112) 29-70-02; e-mail: rector@pskgu.ru

⁴ НИИ кораблестроения и вооружения ВМФ ВУНЦ ВМФ «ВМА», 197101, Санкт-

Петербург, ул. Чапаева, 30

Т/ф 232-79-46; e-mail: vunc-vmf-3fil@mil.ru

Реферат. Исследование проведено с целью выявления перспективности применения рекомбинантных БТШ70 и их производных пролонгированного действия для повышения устойчивости к воздействию пульмонотоксикантами и предотвращению развития токсического отека легких при ингаляционном поражении оксидами азота. Разработано средство на основе рекомбинантного БТШ70 для защиты от токсического отека легких и повышения устойчивости к воздействию пульмонотоксикантами. Рекомбинантный БТШ70 и его производные пролонгированного действия снижают лейкоцитарную инфильтрацию легких, содержание провоспалительных цитокинов - IL6, HMGB1, повышают уровень противовоспалительного цитокина IL10 в крови, а также препятствуют развитию «цитокиновой бури» и токсического отека легких, повышают устойчивость организма к воздействию пульмонотоксикантами. Защитный эффект при ингаляционных поражениях оксидами азота наиболее выражен у конъюгатов БТШ70 с Fc-фрагментом IgG человека — БТШ70-Fc.

Ключевые слова: устойчивость к воздействию пульмонотоксикантами, токсический отек легких, «цитокиновая буря», лейкоцитарная инфильтрация, БТШ70, БТШ70-ПЭГ, БТШ70-Fc.

**PROTECTION AGAINST RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME DURING
INHALATION POISONING BY PULMONOTOXICANTS**

Zemlyanoi A.V.¹, Onikienko S.B.², Vivulanets E.V.¹, Varlashova M.B.¹, Torkunov P.A.³,
Borodavko V.K.⁴

¹ Federal State Unitary Enterprise "Scientific-Research Institute of Hygiene,
Occupational Pathology and Human Ecology"

Military Medical Academy named after S.M. Kirov Russian Defense Ministry

³ Pskov State University

⁴ Naval Research Institute for Shipbuilding and Armaments, Kuznetsov Naval Academy Military
Educational and Research Center

Abstract. Research aimed to assess the use of HSP70 recombinant proteins and their prolonged-action derivatives for enhancing resistance to pulmonary toxicants and preventing toxic pulmonary edema on inhalation intoxication with nitrogen oxides was performed. A remedy against toxic pulmonary edema and for enhancement of pulmonary toxicants was developed. Recombinant HSP70 and its prolonged-action derivatives decrease leukocyte infiltration and the blood levels of the IL6 and HMGB1 anti-inflammatory cytokines and increase the blood level of the IL10 anti-inflammatory cytokine. They prevent the cytokine shock and toxic pulmonary edema and enhance resistance to pulmonary toxicants. The most expressed protective effect on inhalation intoxications with nitrogen oxides is characteristic of HSP7 conjugates with human IgG–Fc fragment (HSP70–Fc).

Keywords: resistance to pulmonary toxicants, toxic pulmonary edema, cytokine storm, leukocyte infiltration, HSP70, HSP70-PEG, HSP70-Fc.

Введение.

Пульмонотоксиканты занимают одно из ведущих мест в перечне высокотоксичных химических веществ, ингаляционные поражения которыми наиболее вероятны в результате техногенных катастроф на химических объектах, авариях при обслуживании ракетной техники, пожарах. Формирование патологических процессов при действии, в частности, удушающих веществ (оксиды азота, фосген и др.), имеет общий характер. В результате отравления у пострадавших развивается такое грозное осложнение как острый токсический отек легких (ТОЛ).

До настоящего времени актуальным является поиск и разработка средств профилактики и неотложной терапии интоксикаций пульмонотоксикантами, средств по снижению выраженности ТОЛ.

В патогенезе ТОЛ важную роль играют активация Fc-рецепторов легких [3], развитие в легких тканевой лейкоцитарной инфильтрации и «цитокиновой бури», индукция провоспалительных цитокинов – IL6 и амфотерина (HMGB1) [5, 7].

Применение антигипоксантов на основе конденсированных индолов [2], антиоксидантов [8], электрофильных соединений – гексаметилентетрамин, цистеин, глутатион [9], ингибиторов NO-синтазы [1], перфторана [10], низкомолекулярного гепарина [11], полифенолов – производных урсоловой и кофейной кислот [12, 4], индукторов БТШ70 [5, 6] недостаточно эффективно препятствуют развитию ТОЛ.

Настоящее исследование посвящено уточнению механизмов развития ТОЛ и разработке новых высокоэффективных средств повышения устойчивости к воздействию пульмонотоксикантами и предупреждения развития ТОЛ.

Материалы и методы.

Исследования выполнены на 100 белых мышах-самцах линии СВА массой 20-24 г, которых подвергали острому ингаляционному воздействию оксидами азота. Для повышения устойчивости к воздействию пульмонотоксиканта и предотвращения развития ТОЛ использовали БТШ70, его конъюгаты с полиэтиленгликолем (БТШ70-ПЭГ) и гибридные белки на основе БТШ70 и Fc-фрагмента антител человека (БТШ70-Fc). Животные были разделены на 5 групп. БТШ70 вводили внутривентрально в дозе 50 мкг на мышь через 10 минут после отравления с последующим ежедневным введением в течение 4 суток. Животным 1 группы вводили рекомбинантный БТШ70, 2 группы – БТШ70-ПЭГ, 3 группы – БТШ70-Fc, 4 группы (контроль) – физиологический раствор в том же объеме, 5 группа – интактные животные. Выраженность отека легких определяли по легочному коэффициенту (ЛК) по формуле:

$$\text{ЛК} = \text{масса легких} / \text{масса животного} \times 1000.$$

В плазме крови мышей определяли уровень иммуноцитокинов – IL6, IL10, HMGB1 (иммуноферментный анализ на анализаторе Personal LAB, Adaltis, Италия с использованием специфических компонентов к цитокинам мышей фирмы «R&D Systems», США). Содержание в крови лактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли на анализаторе SAPPHERE-400 (Tokyo Boeki Ltd., Япония).

Результаты и анализ исследований.

Установлено, что введение БТШ70 и их производных пролонгированного действия достоверно повышают выживаемость экспериментальных животных при развитии ТОЛ

после воздействия оксидами азота. В группе контроля выживаемость составила 10 %. В группах с введением БТШ70, БТШ70-РЕГ и БТШ70-Fc она повысилась до 65, 80 и 90 %, соответственно, что в 6,5–9,0 раз превышает показатели группы контроля.

Защитный эффект БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc был достоверно более выражен, чем у не модифицированного рекомбинантного БТШ70.

Изменение соотношения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL6/IL10) и снижение уровня цитокина позднего действия HMGB1 под влиянием БТШ70 и их производных пролонгированного действия свидетельствует о том, что они подавляют системный иммунный воспалительный ответ при ТОЛ (таблица). Наиболее выраженный защитный эффект выявлен у БТШ70-Fc.

Таблица – Влияние БТШ70 на выживаемость, легочный коэффициент, биохимические показатели, уровень цитокинов в сыворотке крови у мышей через 24 ч после интоксикации оксидами азота, $M \pm m$

Параметры	Группы животных				
	БТШ70	БТШ70-ПЭГ	БТШ70-Fc	Контроль	Интактные
Выживаемость, %	65*	80*	90*	10	100
IL6, пг/мл	424,4±60,2*	392,5±95,6*	331,9±54,5*	1790,4±253,5*	45,0±1,2
IL10, пг/мл	223,5±41,3*	208,5±77,4*	261,3±79,7*	21,3±6,8*	5,1±0,8
IL6/ IL10	1,90*	1,88*	1,27*	84,1*	8,8
HMGB1, нг/мл	109,7±13,5*	89,6±24,7*	75,3±25,8*	216±16,6	6,5±0,8
ЛК	15,5±1,3*	12,4±1,4*	9,8±0,7*	22,4±1,5*	7,8±0,6
ЛДГ, ЕД/л	2251±425*	1985±430*	1230±545*	3521 ±495*	183,2 ±10,5
Примечания: * - различия статистически значимы при $P \leq 0,05$ по сравнению с контролем					

Маркерами токсического поражения легких являются увеличение ЛК, повышение активности ЛДГ, провоспалительных цитокинов IL6 и HMGB1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что БТШ70 и его производные повышают устойчивость организма экспериментальных животных к воздействию пульмонотоксиканта и препятствуют развитию ТОЛ (таблица).

Установлено, что защитный эффект БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc достоверно более выражен ($P \leq 0,05$) в сравнении с эффектом не модифицированного рекомбинантного БТШ70.

Результаты морфометрии биоптатов свидетельствуют о том, что ингаляционное поражение оксидами азота сопровождается развитием лейкоцитарной инфильтрации легких, признаками интерстициального и альвеолярного отека легких, интраальвеолярных геморрагий.

Установлено, что тяжесть течения ТОЛ коррелирует с показателями содержания в крови провоспалительного цитокина позднего действия HMGB1. Результаты исследования выявили, что при содержании HMGB1 в плазме ниже 90 нг/л характерен

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 21 МАЯ 2020
благоприятный прогноз течения ТОЛ; при повышении значений выше 185 нг/л – неблагоприятный.

В клинической практике при массовом ингаляционном отравлении военнослужащих (20 человек) оксидами азота получены предварительные результаты, свидетельствующие также о корреляции уровня HMGB1 с тяжестью течения интоксикации.

Рекомбинантные БТШ70 и их производные пролонгированного действия значительно уменьшают выраженность воспалительной лейкоцитарной инфильтрации легких и предотвращают развитие ТОЛ. Наиболее выраженными защитными свойствами обладают гибридные белки на основе БТШ70 и Fc-фрагмента антител человека - БТШ70-Fc.

Заключение.

Острый респираторный дистресс-синдром - это локализованный ответ на системное воспаление. В его патогенезе важную играют механизмы вышедшей из-под контроля системной воспалительной реакции на токсическое воздействие. Высокая летальность при остром респираторном дистресс-синдроме (60-80 %) коррелирует с повышением уровня воспалительных цитокинов IL-6 и HMGB1 (амфотерина) [13]. Параллельно с активацией каскада провоспалительных цитокинов запускаются и противовоспалительные механизмы — IL-10, α 2-макроглобулин, антагонисты рецепторов TNF и IL-1 [14]. Блокада системного воспаления способствует снижению летальности и препятствует развитию острого респираторного дистресс-синдрома [15].

Молекулярные механизмы защитного действия БТШ70, БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc при остром респираторном дистресс-синдроме включают нейтрализацию воспалительного цитокина HMGB1, ликвидацию выраженного дисбаланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL-6/IL-10). Наиболее эффективным было применение БТШ70-Fc.

Результаты исследования подтверждены работами, которые свидетельствуют о том, что повышение уровня HMGB1 является маркером неблагоприятного прогноза респираторного дистресс-синдрома, а повышение уровня БТШ70, наоборот, предотвращает его развитие.

Рекомбинантные защитные белки стресса - БТШ70 и их производные пролонгированного действия – конъюгаты БТШ70 с полиэтиленгликолем и гибридные белки на основе БТШ70 и Fc-фрагмента антител человека являются перспективными средствами повышения устойчивости организма к действию пульмонотоксикантов,

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 21 МАЯ 2020
предотвращения развития «цитокиновой бури», снижения выраженности ТОЛ,
развивающихся при интоксикации оксидами азота.

Литература

1. Торкунов П.А., Шабанов П.Д. Применение ингибиторов NO-синтазы, производных L-аргинина для предотвращения экспериментального токсического отека легких / Эксперим. клинич. фармакол. 2009. N 2. С. 44–46.
2. Торкунов П.А. Фармакологическая коррекция токсического отека легких / Автореф. ... дисс. докт. мед. наук 14.00/25 – фармакология, клиническая фармакология, 14.00.16 – патологическая физиология. С-Пб. 2007. 52 с.
3. Fudala R., Krupa A., Stankowska D., Allen T. C., Kurdowska A. K. Does activation of the FcγRIIa play a role in the pathogenesis of the acute lung injury/acute respiratory distress syndrome? / Clin. Sci. (Lond). 2010. Vol. 118. N 8. P. 519–526.
4. Wang P., Ye X. L., Liu R., Chen H. L., Liang X. Mechanism of acute lung injury due to phosgene exposition and its protection by caffeic acid phenethyl ester in the rat / Experim. Toxicol. Pathol. 2013. Vol. 65. N 3. P. 311–318.
5. Kwon W. Y., Suh G. J., Kim K. S., Jo Y. H., Lee J. H. Glutamine attenuates acute lung injury by inhibition of high mobility group box protein-1 expression during sepsis / Br. J. Nutr. 2010. Vol. 103. N 6. – P. 890-898.
6. Li W., Qiu X., Wang J., Sun Y. The therapeutic efficacy of glutamine for rats with smoking inhalation injury / Int. Immunopharmacol. 2013. Vol. 16. N 2. P. 248–253.
7. Zhou X., Dai Q., Huang X. Neutrophils in acute lung injury / Front. Biosci. 2012. Vol. 17. P. 2278-2283.
8. Ji L., Liu R., Zhang X.D., Chen H.L., Bai H., Wang X. N-acetylcysteine attenuates phosgene-induced acute lung injury via up-regulation of Nrf2 expression / Inhal. Toxicol. 2010. Vol. 22. N 7. P. 535-542.
9. Pauluhn J., Hai C.X. Attempts to counteract phosgene-induced acute lung injury by instant high-dose aerosol exposure to hexamethylenetetramine, cysteine or glutathione / Inhal. Toxicol. 2011. Vol. 23. N 1. P. 58–64.
10. Hou S., Ding H., Lv Q., Yin X., Song J. Therapeutic effect of intravenous infusion of perfluorocarbon emulsion on LPS-induced acute lung injury in rats / PLoS One. 2014. Vol. 9. N 1. – e: 87826 (12 pp).
11. Luan Z., Naranpurev X.C., Ma G, Luan Z.G. Treatment of Low Molecular Weight Heparin Inhibits Systemic Inflammation and Prevents Endotoxin - Induced Acute Lung Injury in Rats / Inflammation. 2014. Vol. 37. N 2. P. 147-151.

12. Chen X., Wan Y., Zhou T., Li J., Wei Y. Ursolic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in a mouse model / Immunotherapy 2013. Vol. 5. N 1. P. 39-47.
13. Li W. The Association Between the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Mortality in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome: A Retrospective Cohort Study / Shock. 2019. V. 51. N 2. P. 161-167.
14. Qui L. High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) and Autophagy in Acute Lung Injury (ALI) / Med. Sci. Monit. 2019. V.25 P. 1828-1837. doi: 10.12659/MSM.912867.
15. Meduri G.U. Activation and regulation of systemic inflammation in ARDS: rationale for prolonged glucocorticoid therapy / Chest. 2009. V. 136. N 6. P. 1631-1643.