

Я.Н.Шойхет, А.В.Лепилов, Ю.Г.Мотин, Ю.В.Кореновский

## Значение оксидативного повреждения в развитии острых абсцессов легких

Алтайский государственный медицинский университет: 656038, Барнаул, пр. Ленина, 40

Ya.N.Shoikhet, A.V.Lepilov, Yu.G.Motin, Yu.V.Korenovsky

## The importance of oxidative damage of the lungs for the occurrence of acute lung abscess

### Summary

Results of pathomorphological and immunohistochemical investigations in pulmonary tissue species from patients with acute lung abscess have been analyzed in the paper. Three clinical and morphological patterns of course of the disease were defined. Particularities of mitochondrial superoxide dismutase and malone dialdehyde expression in the lung were shown.

**Key words:** lung, acute abscess, oxidative damage.

### Резюме

Были проанализированы результаты патоморфологического и иммуногистохимического исследований респираторного отдела больных острыми абсцессами легких. Показаны 3 клинико-морфологических варианта течения патологического процесса. Определены особенности экспрессии маркеров оксидативного повреждения (митохондриальной супероксиддисмутазы и малонового диальдегида) в респираторном отделе легких.

**Ключевые слова:** легкое, острый абсцесс, оксидативное повреждение.

Воспалительные заболевания легких характеризуются резким усилением окислительных процессов в тканях легкого. В норме внутриклеточные антиоксидантные ферменты нейтрализуют свободные радикалы и подавляют выработку медиаторов воспаления, препятствуя повреждению клеток и тканей. Преобладание продукции свободных радикалов над их нейтрализацией (оксидативный стресс) вызывает повреждение бронхов и паренхимы легкого, а также приводит к изменению локального иммунного ответа, повышая риск инфицирования [1].

Установлено, что у больных с деструктивными процессами легких активируется перекисное окисление липидов (ПОЛ) на фоне угнетения активности системы антиоксидантной защиты. Деструкция тканей легкого сопровождается угнетением фибринолиза, прогрессированием микротромбообразования с развитием синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови [2].

Воспалительные процессы в организме, вызываемые инфекционными факторами, имеют в своей основе процессы деструкции мембраны клеток. Первичные продукты ПОЛ разрушаются с образованием вторичных продуктов ПОЛ. Малоновый диальдегид (МДА) является конечным продуктом ПОЛ и служит одним из маркеров оксидативного повреждения тканей [3].

Среди множества источников свободных радикалов основным местом их продукции является дыхательная цепь цитохромов внутренней мембраны митохондрий [4]. Более того, митохондрии являются основным источником МДА, а локальная система митохондриальной антиоксидантной защиты — это

важнейший органичивающий фактор распространения свободных радикалов и ограничения выхода растворимого цитохрома С в цитоплазму клетки. Учитывая, что неконтролируемая гибель клетки от оксидативного стресса вызывает воспаление, локальная митохондриальная ферментная система имеет принципиальное значение для ограничения повреждения в тканях.

Первым ферментом в каскаде нейтрализации свободных радикалов в митохондриях является супероксиддисмутаза-2 (СОД-2). Она локализуется в матриксе митохондрий, где превращает супероксидный радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) в перекись водорода ( $H_2O_2$ ).

Исследование распределения продуктов перекисного окисления и митохондриальных антиоксидантных ферментов в тканях легкого позволит выявить отдельные патоморфогенетические механизмы развития острых гнойно-деструктивных заболеваний легких.

Цель исследования — определить закономерности патоморфологических изменений тканей легкого и особенности экспрессии показателей оксидативного повреждения (малонового диальдегида) и антиоксидантной защиты (митохондриальной супероксиддисмутазы) у больных острыми абсцессами легких.

### Материалы и методы

Исследованы ткани респираторного отдела 97 больных с острым абсцессом легких, в т. ч. 69 пациентов без секвестрации и 28 больных с секвестрацией. Возраст пациентов варьировался от 24 до 80 лет,

составляя в среднем  $52,0 \pm 11,6$  года (стандартная ошибка среднего — 1,19)

Материал фиксировали в 10%-ном растворе формалина, затем заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином Вейгерта, по Гордону—Свиту, по методу А.Н.Яцковского, проводили ШИК-реакцию. Для оценки процессов фибринообразования и фибриностабилизации использовали окраску на фибрин по Пикро—Маллори II и MSB-метод в модификации Д.Д.Зербино [5].

Для определения экспрессии СОД-2 и МДА использовали непрямой 2-шаговый стрептавидин-биотиновый метод с контролем специфичности реакции. После стандартной процедуры депарафинизации и регидратации выполняли блокирование эндогенной пероксидазы согласно рекомендациям производителя антител (*Santa Cruz*, США).

Восстановление антигенной специфичности производилось с помощью предварительной обработки срезов, погруженных в цитратный буфер (pH — 6,0) в микроволновой печи при мощности 600 Вт 3 раза по 7 мин [6].

В качестве первичных антител использовали антитела к СОД-2 (G-20: sc-18504), 1 : 100, и антитела к МДА (F-25: sc-130087), 1 : 30, фирмы *Santa Cruz* (США).

Продукт реакции визуализировали с помощью системы *Goat ABC Staining system: sc-2023* (*Santa Cruz*, США) и диаминобензидина (ДАБ).

Морфометрические исследования проводили с использованием графических пакетов *ImageJ 1.43* и *AxioVision 3.4LE* (*Carl Zeiss*, Германия). Степень экспрессии МАД и СОД-2 элементами респираторного отдела легких (в баллах — 1+, 2+, 3+) оценивали по интенсивности окрашивания ДАБ с применением программы анализа изображений *ImageJ 1.43*.

Полученные данные обрабатывались статистически с использованием компьютерных программ *JMP 5.1* и *SigmaStat 3.10*. Оценку межгрупповых различий проводили по U-критерию Манна—Уитни или критерию Холма—Сидака при нормальном распределении признака и равенстве дисперсий, сравнение качественных признаков — с помощью критерия  $\chi^2$ . За уровень статистической значимости принимали  $p < 0,05$ . Результаты работы представлены в виде значений  $M$  (среднее арифметическое)  $\pm m$  (ошибка среднего).

## Результаты

Морфологическое исследование позволило выделить 3 варианта структурной перестройки респираторного отдела у больных острыми абсцессами легких [7]. Эти структурные варианты имели отличительные признаки в зависимости от степени выраженности процессов фибринообразования и фибриностабилизации, функционального состояния клеточных популяций воспалительного инфильтрата и характера нарушений микроциркуляторного русла респираторного отдела легких.

Первый морфологический вариант отмечен нами у 58 % больных острым абсцессом легкого без секвестрации и у 7,1 % больных острым абсцессом легкого с секвестрацией. Фокус гнойной деструкции был четко ограничен от окружающих тканей "молодыми" фибриновыми депозитами со сроком фибринообразования от 2 до 48 ч. Воспалительный клеточный инфильтрат содержал  $61,8 \pm 2,19$  % нейтрофилов,  $33,4 \pm 0,97$  % макрофагов и  $4,76 \pm 0,16$  % лимфоцитов. В области фибринового блока наблюдалось формирование микрополостей вокруг клеточных популяций воспалительного инфильтрата. Функциональную активность сохраняли  $61,7 \pm 2,21$  % макрофагов,  $82,1 \pm 3,08$  % нейтрофилов и  $89,5 \pm 2,39$  % лимфоцитов.

Иммуногистохимическое исследование показало выраженную (3+) экспрессию СОД-2 в цитоплазме клеток альвеолярной выстилки и клеточных популяций воспалительного инфильтрата (рис. 1). Экспрессия МДА была слабо выраженной (1+) и статистически значимо меньшей ( $p < 0,05$ ), чем при других морфологических вариантах.

Микрососуды в области ограничения острого гнойно-деструктивного очага были полнокровны. В их просвете не обнаруживалось фибриновых депозитов, лишь в единичных случаях в гемокапиллярах наблюдали нежную сеточку "юного" фибрина на поверхности лейкоцитов. Таким образом, сохранялась проходимость кровеносных сосудов для форменных элементов крови. Относительная площадь сечения сосудов составила  $14,7 \pm 1,09$  мкм<sup>2</sup>, количество сосудов на единицу площади —  $3,45 \pm 0,37$ .

Второй морфологический вариант наблюдался у подавляющего большинства (85,7 %) больных острым абсцессом легкого с секвестрацией и у 26,1 % пациентов с острым абсцессом без секвестрации. В респираторном отделе процессы фибринообразования доминировали над фибринолизом. При этом наблюдалось выраженное ограничение гнойно-деструктивного очага "молодым" и "созревающим" фибрином. В области фибринового блока фибриновые депозиты образовывали плотную сеть, в которую

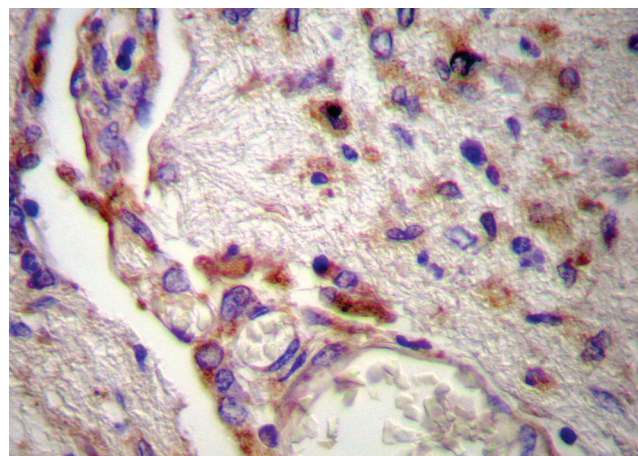


Рис. 1. Первый морфологический вариант развития острого абсцесса легкого: выраженная экспрессия митохондриальной супероксиддисмутазы клетками альвеолярной выстилки и воспалительного инфильтрата;  $\times 400$



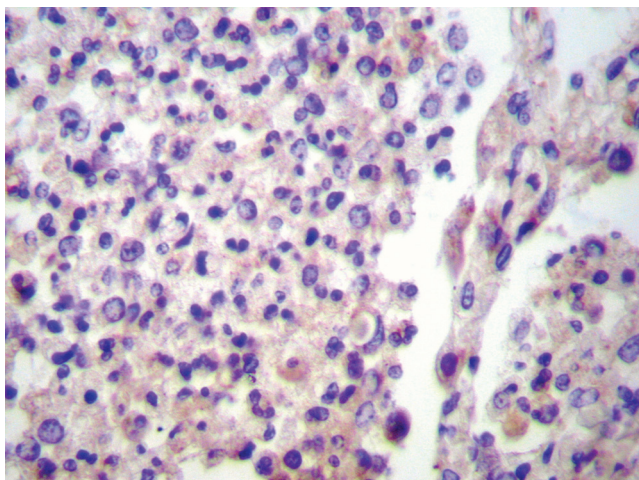


Рис. 2. Второй морфологический вариант абсцесса легкого: слабая экспрессия митохондриальной супероксиддисмутазы клеточными популяциями, замкнутыми в "фибриновый кокон";  $\times 400$

буквально оказывались "вмонтированы" клеточные популяции воспалительного инфильтрата. В его составе обнаруживалось умеренное количество нейтрофилов и макрофагов ( $54,8 \pm 1,64$  % и  $44,2 \pm 1,46$  % соответственно) и незначительное число клеток лимфоцитарного ряда ( $0,98 \pm 0,03$  %).

Функциональная активность сохранялась у  $58,8 \pm 2,22$  % нейтрофилов,  $49,8 \pm 1,38$  % макрофагов и  $60,8 \pm 1,73$  % лимфоцитов. Уровень экспрессии СОД-2 клеточными популяциями воспалительного инфильтрата и респираторной выстилки был слабо выражен (1+), статистически значимо слабее, чем при 1-м морфологическом варианте (рис. 2). При этом в тканях и клетках определялось достоверно большее (2+) содержание МДА.

В просвете кровеносных сосудов присутствовали массивные отложения фибрина, проходимость кровеносных сосудов была нарушена. Выявлялись слущивание эндотелия, набухание стенки сосуда, инфильтрация ее клетками лимфогистиоцитарного ряда, конгломераты мононуклеарных клеток в просвете сосудов. Относительная площадь сечения сосудов составила  $9,68 \pm 1,23$  мкм<sup>2</sup>, количество сосудов на единице площади —  $3,63 \pm 0,69$ .

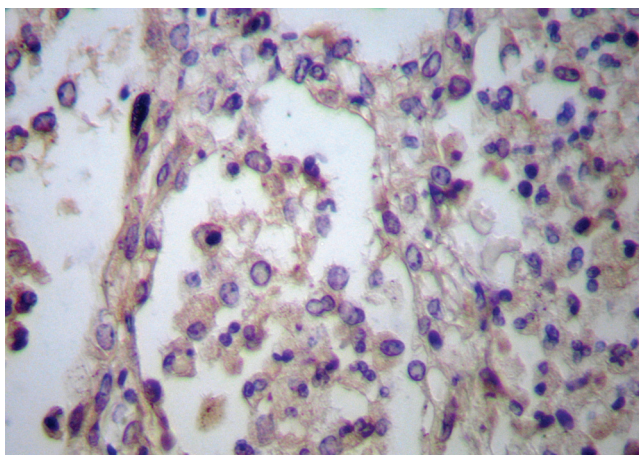


Рис. 3. Третий морфологический вариант абсцесса легкого: выраженная экспрессия малонового диальдегида клетками воспалительного инфильтрата;  $\times 400$

Третий морфологический вариант наблюдался у 15,9 % больных острым абсцессом легкого без секвестрации и у 7,1 % — с секвестрацией. На светоптическом уровне отмечалось слабо выраженное ограничение очага деструкции со слабым формированием фибринового блока из "молодых" фибриновых депозитов. Гнойный экссудат содержал относительно большое количество нейтрофилов ( $64,82 \pm 4,8$  %) при умеренном ( $34,66 \pm 3,67$  %) и незначительном ( $1,18 \pm 0,13$  %) числе макрофагов и лимфоцитов, расположенных среди немногочисленных хаотично ориентированных нитей молодого фибрина. В целом процессы фибринообразования и фибринастабилизации характеризовались тенденцией к ускоренному переходу "юного" и "молодого" фибрина в более зрелые формы. Функциональная активность макрофагов была в значительной степени снижена ( $49,1 \pm 2,83$  %) на фоне относительно сохраненной или повышенной активности нейтрофилов и лимфоцитов ( $63,9 \pm 3,53$  % и  $82,5 \pm 3,81$  % соответственно).

Определялась слабо выраженная (1+) экспрессия СОД-2 в цитоплазме клеток альвеолярной выстилки и лейкоцитов клеточного инфильтрата. На этом фоне экспрессия МДА была хорошо выраженной (3+) и статистически значимо превышала показатели в других группах (рис. 3).

Наблюдалась выраженная деструкция эластических элементов респираторного отдела легких (рис. 4) на фоне относительно сохраненных ретикулярных структур. Это косвенно подтверждает высокую активность процессов оксидативного повреждения, т. к. одним из последствий разрушительного воздействия свободных радикалов, появляющихся в большом количестве при развитии оксидативного стресса, является деструкция эластических элементов респираторного отдела легких.

Сосуды микроциркуляторного русла в большинстве наблюдений оставались проходимы. Стенки сосудов и периваскулярно расположенные ткани легкого подвергались склеротическим изменениям.

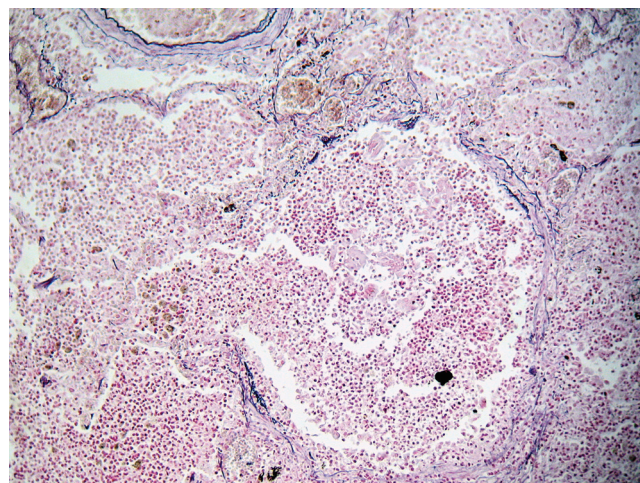


Рис. 4. Третий морфологический вариант абсцесса легкого: разрушение элементов эластического каркаса легких в перифокальной острой гнойной деструкции области. Окраска пикрофуксином Вейгерта;  $\times 100$

## Обсуждение

У пациентов с острым абсцессом легкого особенности структурно-функциональных нарушений респираторного отдела обусловлены клинической формой заболевания, особенностями процессов фибринообразования и фибриностабилизации, активности клеточных популяций воспалительного инфильтрата, проходимости сосудов микроциркуляторного русла и степенью изменения соотношений процессов оксидативного повреждения тканей и антиоксидантной защиты.

Проведенные ранее исследования позволили выделить 3 клинко-морфологические формы течения острого абсцесса легкого [7]. При 1-м морфологическом варианте мембранные рецепторы макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов не блокировались фибриновыми депозитами, и таким образом обеспечивалась возможность выполнения клетками своих биологических функций.

При помощи иммуногистохимических методик удалось показать, что при 1-м клинко-морфологическом варианте в условиях сохранения функциональной активности клеточных популяций и в отсутствие блокирования мембранных рецепторов фибрином экспрессия СОД-2 в исследуемых группах была максимальной и протекала на фоне слабой экспрессии МАД. Высокий уровень экспрессии СОД-2 свидетельствует об активных процессах антиоксидантной защиты в респираторном отделе легких и в определенной мере обуславливает положительную динамику развития преобразовательных процессов при таком морфологическом варианте течения гнойно-деструктивных процессов.

В случае, когда преобладали процессы фибринообразования, наблюдалось замыкание фагоцитов в "фибриновый кокон" (2-й клинко-морфологический вариант) и блокирование их функциональной активности, что приводило к невозможности элиминации "юного" и "молодого" фибрина, его созреванию и развитию склеротических изменений. Функциональная активность клеток была снижена, отмечалась активация перекисного окисления на фоне пониженной экспрессии СОД-2.

В 3-м клинко-морфологическом варианте, с тенденцией к ускоренному переходу "юного" и "молодого" фибрина в более зрелые формы, наблюдались выраженные распространенные деструктивные изменения респираторного отдела легких. Среди факторов, обуславливающих развитие таких процессов, — не только снижение функциональной активности мононуклеарных фагоцитов на фоне усиления протеолитической активности нейтрофилов, но и значительный уровень ПОЛ, превышающий показатели

2 других морфологических вариантов на фоне низкой экспрессии митохондриальных антиоксидантных ферментов.

## Заключение

Таким образом, у больных острым абсцессом легкого патоморфологическая перестройка респираторного отдела легких обусловлена особенностями протекания процессов фибринообразования и фибриностабилизации, проходимостью сосудов микроциркуляторного русла, активностью клеточных популяций воспалительного инфильтрата, а также особенностями распределения и уровнем экспрессии продуктов перекисного окисления и митохондриальных антиоксидантных ферментов в тканях легкого.

## Литература

1. Бердникова Н.Г., Цыганко Д.В., Демидова Г.В. Особенности применения ацетилцистеина в клинической практике. Рус. мед. журн. 2007; 3 (16): 1–4.
2. Лапшин С.П. Эндотоксемия и гемостазиологические нарушения у больных с деструктивными осложнениями внебольничной пневмонии. Бюл. СО РАМН 2007; 6 (128): 5–11.
3. Иванова З.О. Изменение показателей малонового диальдегида при пневмонии бактериальной этиологии. Фундамент. исслед. 2008; 1: 105.
4. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 2002; 82: 47–95.
5. Зербино Д.Д. Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови: Факты и концепции. М.: Медицина; 1989.
6. Гуревич Л.Е., Исаков В.А. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности воздействием микроволн на ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафин. Арх. пат. 1999; 2: 48–50.
7. Шойхет Я.Н., Лепилов А.В., Мотин Ю.Г. и др. Клинко-морфологические сопоставления острых абсцессов легких. Пульмонология 2009; 2: 60–65.

## Информация об авторах

Шойхет Яков Нахманович – д. м. н., проф., чл.-корр. РАМН, зав. кафедрой факультетской хирургии им. проф. И.И.Неймарка с курсом хирургии ФПК и ППС Алтайского государственного медицинского университета; тел.: (3852) 68-50-23; e-mail: fakhir@agmu.ru

Лепилов Александр Васильевич – д. м. н., проф. кафедры патологической анатомии с секционным курсом Алтайского государственного медицинского университета; тел.: (3852) 40-15-44; e-mail: lepilov@list.ru

Мотин Юрий Григорьевич – к. м. н., ассистент кафедры гистологии Алтайского государственного медицинского университета; тел.: (3852) 26-08-64; e-mail: ymotin@mail.ru

Кореновский Юрий Владимирович – к. м. н., ассистент кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета; тел.: (3852) 26-07-02; e-mail: timidin@gmail.com

Поступила 02.11.2012  
© Коллектив авторов, 2011  
УДК 616.24-002.31-092