

На правах рукописи

ТИМОФЕЕВ
Сергей Евгеньевич

О МОРФОГЕНЕЗЕ АТЕЛЕКТАЗОВ
ПРИ РАДИОИНДУЦИРОВАННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ЛЕГКИХ
(клинико-экспериментальное исследование)

3.3.2. - Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва, 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:
доктор медицинских наук

Кириллов Юрий Александрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, **Ариэль Борис Михайлович**
научный консультант Федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук, доцент, **Астрелина Татьяна Алексеевна**
руководитель Центра биомедицинских технологий, заведующая кафедрой регенеративной медицины, гематологии, молекулярной цитогенетики с курсом педиатрии МБУ ИНО Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.177.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» и на сайте <http://www.morfolhum.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ателектаз лёгкого принадлежит к важнейшим, но мало изученным проявлениям патологии органов дыхания, традиционно доминирующей в структуре наиболее распространенных заболеваний человека. Ателектаз лёгких может быть серьёзным осложнением предсуществующей лёгочной патологии, либо рефлекторно возникать при операциях на органах внутригрудной, внутрибрюшной локализаций или в раннем послеоперационном периоде (Nguyen, T.K. и др., 2021). Количество регистрируемых в последнее время ателектазов лёгкого не только не уменьшилось, но приобрело устойчивую тенденцию к увеличению (Bjaanaes, M.M. и др., 2021; Møller, D.S. и др, 2014; Montero, A., 2013).

Причины развития ателектаза легких достаточно широки, начиная от травматического повреждения грудной клетки, последствий расширенных операций на легких, вирусных пневмоний, ожогов поверхности тела, ингаляционной травмы, общего наркоза, обтурации бронха и различных экзогенных воздействий, включая химическое или лучевое поражение легких. Данные клинических наблюдений свидетельствуют, что примерно в трети случаев после лучевой терапии могут появиться ателектазы или иные признаки лёгочной патологии (Karlsson, K. и др. 2013; Ren, C. и др. 2018; Sumita, K. и др., 2016).

Исследования последних лет, безоговорочно признавая доминирующую роль обструкции и/или существенного лимитирования просвета воздухопроводящих путей в формировании ателектазов, констатируют, во-первых, наличие значительно большего числа факторов, влияющих на пато- и морфогенез ателектазов и, во-вторых, их безусловную сопряженность и реализацию в различные временные периоды (Irwin, R.S и др, 2013). В то же время незначительное количество работ по моделированию ателектазов в эксперименте затрудняет понимание и оценку начальных инициальных изменений легочной ткани, составляющих существо первых звеньев

морфогенеза ателектаза (Каминская, Г.О., 2004). Отсюда актуальной задачей представляется и выделение конкретных механизмов альтерации, лежащих в основе возникновения и реализации ателектазов.

В отличие от клинических наблюдений, при которых прижизненная морфологическая диагностика ателектазов, как правило, не представляется возможной, а исследование секционного материала в большинстве случаев делает крайне затруднительным использование прецизионных методов изучения биологических объектов, включая электронномикроскопическое исследование материала, экспериментальные модели позволяют изучить и описать морфогенез данной патологии полностью, начиная со стадии инициальных повреждений и заканчивая разрешением ателектаза, либо фиброзированием легкого (Lopez-Rodriguez, E. и др.; Beike, L. и др., 2019). Помимо этого, актуальной является проблема разработки и использования новых методов, технологий и лекарственных средств профилактики и лечения ателектазов лёгкого (Rosenberg, O.A. и др., 1994; Wong, M.H. и др., 2013).

Степень разработанности темы исследования

В отечественной медицине последние серьёзные фундаментальные исследования, касающиеся изучения ателектазов лёгких, относятся к 70 – 80 годам прошлого века (Сачек, М.Г., 1975; Чухриенко, Д.П., 1979; Шляпников, В.Н., 1978; Березовский, М.Е., 1979; Магомедов, М.К., 1979). В современных руководствах по пульмонологии и патологической анатомии лёгких ателектазу посвящены в лучшем случае одна-две страницы (Тюрин И.Е. 2007; Черняев, А.Л. 2000). В настоящее время установленными и достаточно изученными можно считать основные причины, предшествующие факторы и условия, при неблагоприятном сочетании которых могут возникнуть ателектазы легких.

В немногочисленных исследованиях содержатся сведения о промежуточных и заключительных фазах морфогенеза ателектаза, после завершения которых ателектаз либо разрешается с восстановлением воздушности легкого в той или иной степени, либо переходит в хроническую стадию с трансформацией в фиброателектаз и склерозирование ткани лёгкого.

Что касается начальных этапов морфогенеза ателектаза, то есть период, когда большинство возникающих общепатологических процессов, включая повреждение и расстройства кровообращения, обратимы и возможна реституция легочной ткани, то они представляют собой своеобразную «terra incognita» (Ahmad, K. и др., 2017; Fellrath, J.M. и др., 2003; Jarzebska, N. И др., 2021). Всё это в полной мере характерно и для ателектазов, возникающих в результате радиоиндуцированного воздействия на ткань легкого (Кириллов, Ю.А. и др., 2020).

Цель исследования

Выявить особенности морфогенеза ателектазов, развивающихся в лёгких при действии ионизирующего излучения на грудную клетку в комплексном лечении рака молочной железы и при экспериментальном радиоиндуцированном повреждении.

Задачи исследования

1. Изучить в эксперименте динамику структурных нарушений в лёгких, а также суммарного содержания и качественного состава фосфолипидов легочного сурфактанта при ателектазах, возникающих вследствие однократного локального рентгеновского облучения.

2. Установить морфологические особенности и морфогенез ателектазов лёгких, возникающих при воздействии ионизирующего γ -излучения на грудную клетку пациентов, страдающих раком молочной железы.

3. Оценить возможность использования раман-спектроскопического исследования для диагностики и оценки изменений, происходящих в паренхиме лёгких при возникновении и развитии ателектазов.

Научная новизна

Впервые установлено, что ателектазы лёгких, как в клинике, так и эксперименте, формируются спустя непродолжительное время после лучевого воздействия. В эксперименте период, в течение которого развиваются инициальные (фоновые) изменения в легочной ткани, предшествующие формированию ателектазов, составляет от 1 до 3 суток от его начала. В клинике

длительность латентного периода, предвещающего появление ателектазов, может варьировать от десяти до 30 суток и более в зависимости от состояния легочной ткани, степени выраженности и компенсированности предсуществующей патологии. Проведенное исследование впервые показало, что как в клинике, так и в эксперименте, в развитии ателектазов имеют значение быстро реализуемые факторы (факторы первого порядка), в частности, разрушение сурфактанта под действием ионизирующего излучения, повреждение эндотелиоцитов капилляров микроциркуляторного русла, расстройства кровообращения, приводящие к нарастающей гипоксии. В качестве медленно реализуемых факторов (факторов второго порядка) следует отнести повреждение (дистрофия и некроз) булавовидных клеток и альвеолоцитов II типа, нарастание бронхо-бронхиолярной обструкции и констрикции, либо существенного лимитирования просвета бронхов и бронхиол.

Для идентификации изменений, происходящих в лёгких при развитии ателектазов, были впервые использованы тонкие чувствительные прецизионные морфологические методы: иммуногистохимия, трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия, физико-химический метод раман-спектроскопии, позволяющий регистрировать «отпечатки» молекул органических и неорганических соединений, кумулирующих в легочной паренхиме в процессе формирования и персистенции ателектазов и дистелектазов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты имеют важное теоретическое значение для патологической анатомии, грудной и абдоминальной хирургии, фтизиопульмонологии, травматологии и ортопедии, анестезиологии и реаниматологии, поскольку вносят существенный вклад в понимание и расширение представлений о морфогенезе ателектазов, возникающих при радиоиндуцированном воздействии на лёгкие.

Результаты исследования существенно дополняют имеющиеся фундаментальные сведения и расширяют существующие теоретические представления о закономерностях возникновения и развития ателектазов легких.

В работе выявлены морфологические особенности и временные характеристики формирующихся в легком ателектазов. Установлено, что первоначально ателектазы и дистелектазы развиваются преимущественно субплеврально и являются монофакторными, сурфактантзависимыми. Ателектазы, расположенные интрапульмонарно, относятся к многофакторным и развиваются на фоне сохраняющегося дефицита сурфактанта, имея в виду не только количественные, но и качественные его характеристики, расстройства кровообращения, прогрессировании бронхиальной и бронхиолярной констрикции и обструкции. Интрапульмонарные ателектазы отличаются от субплевральных многочисленностью, меньшей площадью и мозаичностью расположения.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости использования для профилактики развития ателектазов и терапии в начальной стадии их формирования сурфактант-содержащих препаратов, обладающих не только антиателектатическими, но также антиоксидантными, радиопротективными и эндотелиопротективными эффектами. Таким образом, полученные в результате проведенного исследования данные о морфогенезе ателектазов, развивающихся при воздействии ионизирующего излучения, могут быть положены в основу разработки схемы профилактики и лечения ателектазов, использованы при пересмотре и усовершенствовании Стандартов оказания медицинской помощи пациентам, страдающим заболеваниями органов дыхания и другими, использованы в учебном процессе на лечебном и педиатрическом факультетах высших медицинских учебных заведений, системе непрерывного медицинского образования.

Методология и методы исследования

Для выполнения данной работы была разработана оригинальная методология, базирующаяся на применении метода мультиплексного анализа, проводимого, с одной стороны, для определения в одном образце (препарате), содержащем легочную паренхиму и строму, максимально возможного объема данных посредством использования рутинных общепринятых

(макроскопическое описание, гистологическое изучение) технологий и тонких прецизионных морфологических (иммуногистохимическое, трансмиссионное и сканирующее электронномикроскопическое исследование) подходов. С другой стороны, метод мультиплексного анализа позволяет также одновременно идентифицировать молекулы различных химических соединений, кумулирующихся в легких при радиоиндуцированном воздействии и влияющих на возникновение и развитие в них ателектазов, при помощи современных морфометрических и биофизических (рамановская спектроскопия) методов, предусматривающих использование оригинальных компьютерных программ.

Положения, выносимые на защиту

1. Ателектазы, возникающие при однократном лучевом воздействии на легкое в эксперименте, после непродолжительного предателектатического периода, в течение которого формируются так называемые фоновые изменения, подразделяются на ранние субплевральные, в основе которых лежат количественные и качественные изменения фосфолипидов сурфактанта, расстройства кровообращения и нарастающая гипоксия ткани и поздние интрапульмонарные, возникающие в результате сужения просвета бронхов и бронхиол при сохранении качественного дефицита сурфактанта, обусловленного повреждением булавовидных клеток и альвеолоцитов.

2. У лиц, получавших лучевое воздействие на грудную клетку в комплексном лечении рака молочной железы, возникающие ателектазы также подразделяются на субплевральные и интрапульмонарные и в большинстве случаев имеет место их сочетание, при этом изменения просвета воздухопроводящих путей не играют существенной роли в их возникновении.

3. В экспериментальных условиях возможно как разрешение обоих вариантов ателектазов и восстановление воздушности легочной ткани, так и развитие фиброателектазов. Во всех клинических наблюдениях формирование ателектазов, в отсутствие предсуществующей легочной патологии, является фактором, усиливающим фиброзирование ткани легких.

Личный вклад автора

Автор принял участие в выборе темы диссертационной работы, формулировке ее цели и задач, аргументировал её актуальность на основании тщательного и всестороннего анализа доступной литературы, а также участвовал в разработке методологии исследования. Автор лично определил оптимальное количество клинических наблюдений и экспериментальных животных, необходимых для решения задач настоящей работы, набор необходимых методов исследования, принял участие по их материально-техническому обеспечению. Осуществил забор секционного и экспериментального материала, провел гистологическое, иммуногистохимическое, электронномикроскопическое и морфометрическое исследования, принял участие в анализе, научной интерпретации и статистической обработке полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности: 3.3.2 - патологическая анатомия.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается использованием значительного и адекватного количества научных источников по теме диссертации; разработкой оригинальной методологии исследования, предусматривающей использование метода мультиплексного анализа; применением большого набора разнообразных методов (иммуногистохимический, электронномикроскопический, раман-спектроскопический и др.) изучения образцов легочной ткани; проверки достоверности путем сравнения клинических и экспериментальных данных. Достоверность результатов также подтверждается значительным объемом секционного материала и достаточным количеством исследованных лабораторных животных, адекватностью применённых методик, в том числе методов статистической обработки результатов исследований, качеством использованного оборудования и его сертификацией.

Апробация результатов исследования

Апробация диссертации проведена на межлабораторной конференции ФГБНУ НИИМЧ им. ак. А.П. Авцына (29 ноября 2021 г., протокол № 10). Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на научно-практической конференции «Актуальные вопросы патологической анатомии» (Тюмень, 2018); научной конференции с международным участием, посвященной 170-летию кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова (Москва, 2019); XXXI Европейском конгрессе патологов (Ницца, 2019); научной конференции, посвященной 160-летию кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург, 2019); Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2020); XXXII Европейском конгрессе патологов (Глазго, 2020), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате Института (60-летию НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына), Москва, 2021), XXXIII Европейском конгрессе патологов (Гётеборг, 2021).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России и в практической деятельности патологоанатомического отделения ГБУЗ «Городская клиническая больница №40 Департамента здравоохранения города Москвы».

Публикации результатов работы

По результатам исследования опубликовано 9 работ, в том числе 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, определенных Перечнем ВАК Минобрнауки России.

Объем и структура исследования

Диссертация изложена на 162 страницах, состоит из введения, 4 глав с изложением состояния и степени разработанности темы исследования на

основании анализа современной литературы, использованных методик исследования, основных результатов проведенной работы, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 213 источников, в том числе 43 отечественных и 170 иностранных, а также приложений. Работа иллюстрирована 59 рисунками и 17 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Радиационно-индуцированное воздействие моделировали на 216 белых нелинейных самцах крыс в возрасте 14-18 недель¹. Контрольную группу составили 42 животных, которым имитировали процедуру облучения. Радиационно-индуцированное повреждение легких (РИПЛ) воспроизводили с использованием рентгеновского терапевтического аппарата РУТ-250-15-2 (РУМ-17), доза локального облучения 12 Гр. На каждом сроке эксперимента, для изучения динамики суммарного содержания фосфолипидов легочного сурфактанта (ЛС) а также его фракционного состава в обеих группах лабораторных животных проводили тотальный бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) выделенного правого легкого.

Для изучения последствий воздействия ионизирующего излучения в комплексном лечении рака молочной железы (РМЖ) на лёгкие, выполнили ретроспективное исследование, по результатам которого выбрали 28 результатов патологоанатомических вскрытий пациентов, получавших лучевую терапию по поводу РМЖ, с прижизненного диагностированными ателектазами после курса лучевой терапии.

Гистологическую проводку биологических образцов выполняли по стандартной методике. Иммуногистохимическое исследование для идентификации булавовидных клеток проводили с использованием антител к экспрессируемому ими белку СС16. Электронномикроскопическое

¹ Радиоиндуцированное повреждение лёгких на лабораторных животных моделировали сотрудники отдела биотехнологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им академика А.М. Гранова» Минздрава России под руководством доктора медицинских наук, профессора Розенберга О.А., которым приносим благодарность за помощь в работе.

исследование проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа Zeiss EVO LS10 (Zeiss, Германия) с установленным детектором для просвечивающей микроскопии (STEM).

Для морфометрического исследования выполнили сканирование гистологических препаратов с использованием сканеров Pannoramic MIDI (3DHISTECH Ltd, Венгрия) и Aperio AT2 (LEICA MICROSYSTEMS, Германия), объективы: $\times 20$ Carl Zeiss и $20\times/0.75$ PlanApo соответственно. Просмотр, а также выбор и разметку участков для анализа производили при помощи программного обеспечения Pannoramic Viewer (3DHISTECH Ltd, Венгрия), QuPath v0.2.3 (University of Edinburgh, Великобритания). Морфометрическое исследование цифровых снимков гистологических препаратов осуществляли с использованием программы NIH ImageJ версия 1.52a (National Institutes of Health, США) с дополнительными плагинами.

На цифровых снимках гистологических препаратов, полученных с кардиальной доли правого лёгкого лабораторных животных и фрагментов лёгких секционных наблюдений, измеряли следующие структуры: толщина межальвеолярных перегородок (МАП, μm); площадь альвеол (ПА, μm); площадь внутреннего просвета бронхиолы ($B_{\text{Внутр. площадь}}$), μm ; периметр внутреннего просвета бронхиол ($B_{\text{Внутр. периметр}}$), μm ; площадь, бронхиолы по внешней границе мышечной стенки ($B_{\text{Наружная площадь}}$), μm^2 ; наружный (внешний) периметр бронхиолы ($B_{\text{Наружный периметр}}$) μm ; доля легочного интерстиция (безвоздушных) участков (%); высота эпителиальной выстилки (ВЭ) бронхиол в расчете на 1 μm периметра базальной мембраны; площадь эпителиальной выстилки (ПЭВ) бронхиол в расчете на 1 μm периметра базальной мембраны; площадь ателектазов, μm^2 ; площадь кардиальной доли правого лёгкого, μm^2 . Основываясь на результатах вышеперечисленных измерений, дополнительно произвели расчет следующих показателей: процент сокращения гладких миоцитов в стенке бронхиолы (ПСГМ, %), основываясь на работах (James и др., 1988; Donovan, G.M. и др., 2020); соотношение площади ателектаза к площади кардиальной доли правого лёгкого (%).

Раман-флуоресцентное исследование, сочетавшее в себе как флуоресценцию, так и спектроскопию комбинационного рассеяния, проводили с помощью программно-аппаратного комплекса – анализатора, состоящего из микроскопа Olympus и спектрометра ИнСпектр R532, разработанного ООО «ИнСпектр» (РУ №РЗН 2015/2419 от 18.05.2015).

Статистическое исследование

Статистическую обработку результатов исследования выполнили при помощи специализированного программного обеспечения: R-4.0.4 (The R Foundation, Вена, Австрия), RStudio Desktop (Version 1.3.1093, RStudio Inc, США). Для оценки достоверности различий использовали тесты Вилкоксона, Краскела-Уоллеса. Различия между выборками считали статистическими достоверными при $P\text{-value} < 0,05$. Оценку влияния количественных переменных, на возникновение ателектазов в различные сроки эксперимента выполняли с использованием логистической регрессии.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что несмотря на высокую проникающую способность и идентичность эффектов рентгеновского и гамма-излучения (Гребенюк А.Н. и соавт., 2013, Wittendorn T.R et al., 2021), на светооптическом уровне по истечении первых суток не было отмечено сколько-нибудь выраженных отчетливых изменений легочной паренхимы и воздухопроводящих путей. В то же время наиболее радиочувствительными оказались эндотелиоциты капилляров альвеолярных септ, которые выглядели набухшими, их цитоплазма содержала умеренное количество пиноцитозных пузырьков (везикул). В альвеолоцитах II типа изменения были менее выражены и проявлялись умеренным набуханием митохондрий, нарушением расположения и упорядоченности мембран осмиофильных пластинчатых телец (ОПТ), которые трансформировались в аморфные электронно-плотные конгломераты (Рисунок 1). Считается, что в основе повреждающего действия ионизирующего излучения на те и другие популяции было нарушение структуры ДНК, приводящего к прекращению её репликации (Mori L. et al., 2018).

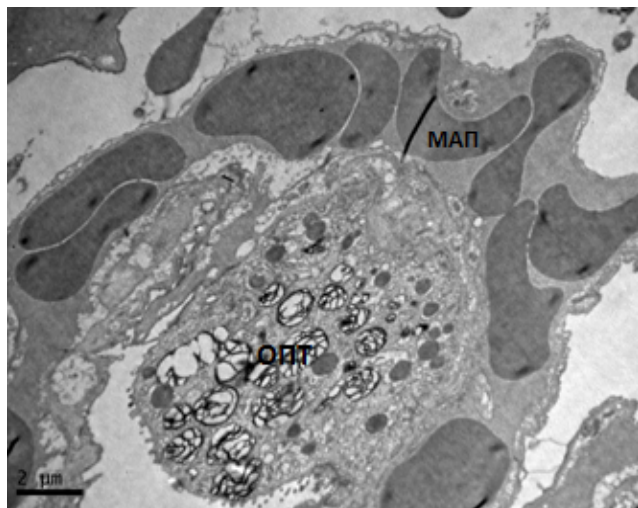


Рисунок 1 - Радиоиндуцированное повреждение легких – 3 сутки. Опустошение ОПТ в альвеолоцитах II типа. Полнокровие капилляров МАП, повышение электронной плотности плазмы крови. ТЭМ $\times 12000$

Спектроскопическое исследование образцов облученного легкого выявило высокие значения интенсивности флуоресценции и умеренные значения рамановского сдвига, обусловленные повышенным содержанием в ткани свободных гидроксильных и метильных радикалов, а также отдельных гидроксильных групп, что по мнению Yin Z. et al., 2019 патогномонично для оксидативного стресса, вызванного

РИПЛ. Утверждения исследователей о нарушении функционирования сурфактант-альвеолярного комплекса при лучевом воздействии на ткань легкого (Дубровская В.Ф. и соавт., 1998, Ерохин В.В. и соавт., 2000, Розенберг О.А. 2014) нашли подтверждение в нашей работе. К завершению инициального периода (3 сутки) нами было отмечено не только самое низкое за весь период эксперимента суммарное содержание фосфолипидов лёгочного сурфактанта в жидкости БАЛ,

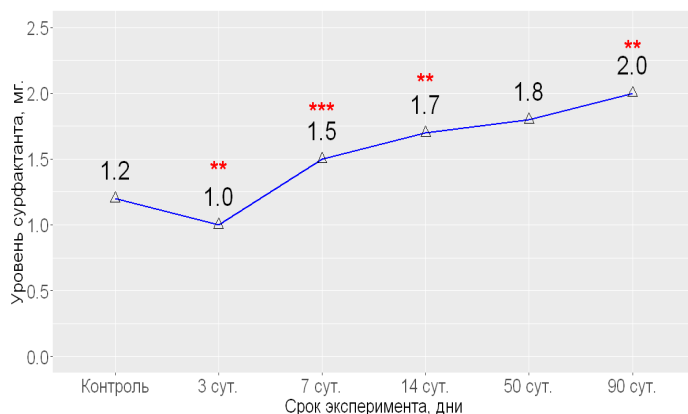


Рисунок 2 - Динамика суммарного содержания фосфолипидов лёгочного сурфактанта в легком лабораторных животных в различные сроки эксперимента (* - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$)

но и нарушение соотношения их фракций (Рисунок 2). В контрольной группе лабораторных животных, которым имитировали процедуру облучения, ателектазов не зафиксировали ни на 7 сутки эксперимента, ни позже. Однако, в группе животных, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения, в кардиальной доле, у

четырёх особей (в 14.3%), идентифицировали ателектазы, расположенные субплеврально (Таблица 1). При этом соотношение суммарной площади

ателектатических участков по отношению к площади кардиальной доли составило 8.2% (Таблица 2).

Таблица 1 - Число лабораторных животных экспериментальной группы с идентифицированными ателектазами на 7-е сутки эксперимента

	7 сутки	
	n	%
Субплевральные ателектазы	4	14.3%
Интрапульмонарные ателектазы	0	0%
Без ателектазов	24	85,7%
Всего	28	100%

Таблица 2 - Показатели общей площади кардиальной доли правого лёгкого, площади зарегистрированных ателектазов и их соотношение, в экспериментальной группе лабораторных животных на 7-ые сутки эксперимента.

Срок эксперимента	n	Площадь кардиальной доли правого легкого тыс. (медиана) μm^2	Медианное значение суммарной площади ателектазов тыс. μm^2	Соотношение суммарной площади ателектазов к площади кардиальной доли правого легкого
7 сутки	4	31 076	2 548	8,2%

Поскольку ни в одном случае мы не наблюдали спадения целого легкого (тотальный ателектаз) или его доли (долевой ателектаз), в зависимости от территории легочной ткани, вовлеченной в процесс спадения, ателектазы были разделены нами на линейные (Рисунок 3), очаговые (Рисунок 4) и распространенные (Рисунок 5).

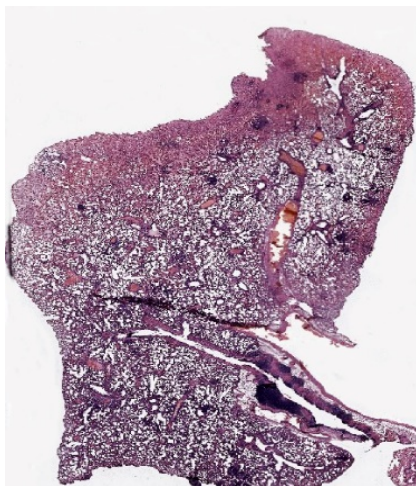


Рисунок 3 - РИПЛ, 2 период. Линейный ателектаз, расположенный в кардиальной доле экспериментального животного. Окраска Н&Е $\times 10$

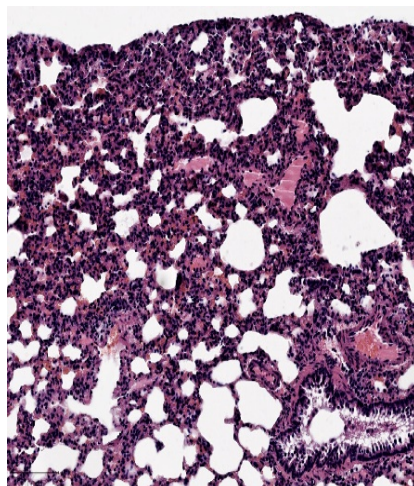


Рисунок 4 - РИПЛ, 2 период. Очаговый субплевральный дистелектаз. Окраска Н&Е $\times 100$

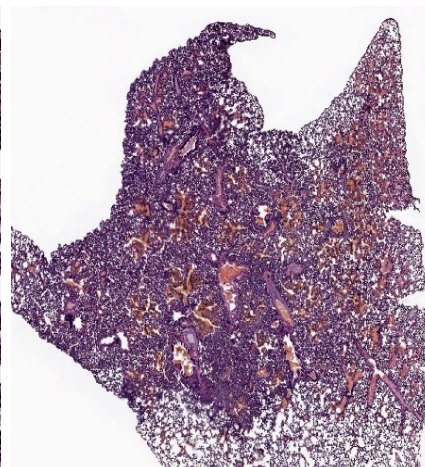


Рисунок 5 - РИПЛ, 2 период. Многовекторный распространенный ателектаз. Окраска Н&Е $\times 10$

Результаты морфометрического исследования представлены в Таблице 3.

Таблица 3 - Результаты морфометрии кардиальной доли правого лёгкого в контроле и на 7-е сутки эксперимента у лабораторных животных

Показатели	Контроль		7 сутки			
			С ателектазами		Без ателектазов	
	Субплевр.	Интрапульм	Субплевр.	Интрапульм	Субплевр.	Интрапульм
Толщина МАП μm ,	6,2	6,4	5,1	9,8	5,9	8,5
ПА μm^2	770	640	456	641	758	632
ПСГМ в стенке бронхиол, %	17,7	18,0	20,8	21,3	20,5	21,4
ВЭ (μm) на 1 μm периметра по БМ	0,025	0,025	0,026	0,026	0,026	0,026
ПЭВ (μm^2) на 1 μm периметра по БМ	16,1	16,5	18,2	17,5	18,6	17,7

Исходя из полученных данных, мы не только отнесли эти ателектазы к категории сурфактант-обусловленных (Ray K. et al., 2014, Sagar A.-E.S et al., 2020), но и впервые при помощи морфометрического исследования доказали их монофакторность на том основании, что прочие изменения легочной ткани и воздухопроводящих путей не играли значимой роли в возникновении субплевральных ателектазов. Для доказательства данного утверждения нами была составлена модель взаимодействия количественных факторов и ателектазов лёгких. Показатели сокращения гладких миоцитов (ПСГМ), площадь эпителиальной выстилки (ПЭВ) и толщина межальвеолярных перегородок (МАП), оказались статистически незначимыми ($P=0.184$, $P=0.794$, $P=0.210$). Процент корректных предсказываний (“accuracy”) в данной регрессионной модели не превысил 60.7%. Коэффициент детерминации R^2 составил 0.06, что позволило сделать заключение о том, что вариация в риске возникновения ателектазов лёгких на 7-е сутки после воздействия ИИ, в экспериментальной группе лабораторных животных не может объясняться предикторами модели.

Следует отметить, что после реализации субплевральных ателектазов суммарное содержание фосфолипидов лёгочного сурфактанта несколько

увеличилось, что свидетельствовало о нивелировании количественной недостаточности сурфактанта (Розенберг О.А. 2014) при сохранении его качественного дефицита в виде снижения фракций дифосфатидилглицерола (кардиолипина), фосфатидилглицерина и фосфатидилэтаноламинов (Дубровская В.Ф. и соавт., 1998).

К 14 суткам эксперимента ателектазы выявили у 11 животных, что составило 37,9%. В 5 случаях (17,2%) присутствовали изолированные интрапульмонарные ателектазы, а в 6 случаях (20,7%) наблюдали сочетание субплевральных и интрапульмонарных ателектазов. Площадь, занимаемая ателектазами увеличилась и составила $5518 \mu\text{m}^2$ (7-е сутки - $2548 \mu\text{m}^2$). Соотношение суммарной площади ателектазов к площади кардиальной доли правого лёгкого также возросло более, чем в 2 раза и составило 18,5%.

В отличие от субплевральных ателектазов, которые, будучи в части случаев распространенными, но все же единичными, внутрилегочные ателектазы, как правило, были более многочисленными (Рисунок 6). К этому времени относится начало реализации обтурационного, по мнению

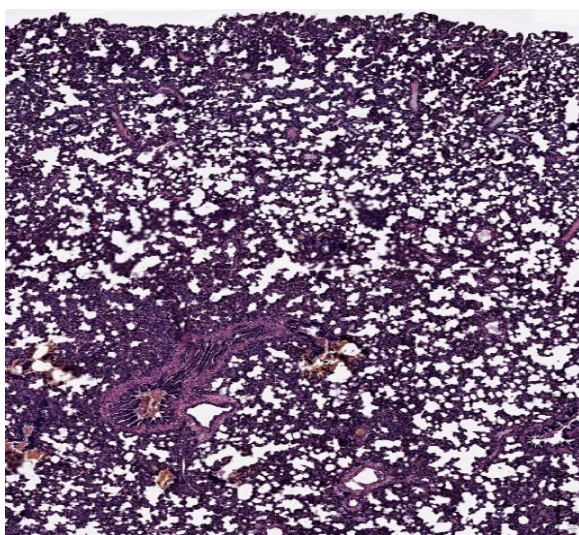


Рисунок 6 РИПЛ, 3 период. Множественные ателектазы и дистелектазы, расположенные интрапульмонарно. Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$

значительной части исследователей ведущего механизма развития интрапульмонарных ателектазов (Ray K. et al., 2014, Fernandez-Bustamante A. et al., 2017, Yin D. et al 2021). Развитие интрапульмонарных ателектазов сопровождалось существенным лимитированием просвета воздухопроводящих путей, обусловленным увеличением высоты и площади эпителиальной выстилки и процента сокращения гладких миоцитов

мышечной оболочки бронхов и бронхиол более выраженном в интрапульмонарных участках по сравнению с субплевральными.

Результаты морфометрического исследования, выполненного на 14-ые

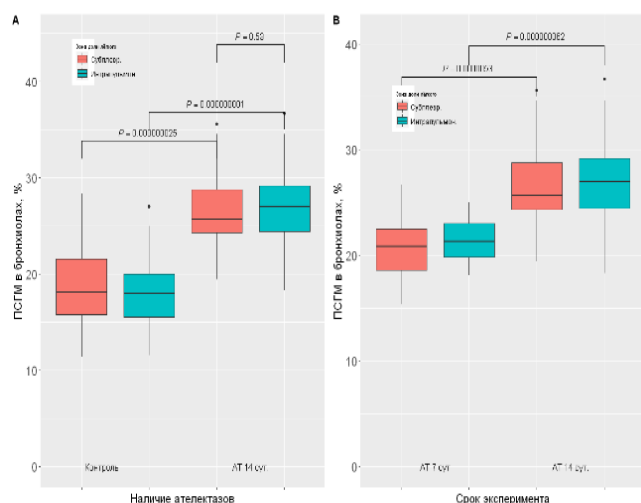


Рисунок 7 – ПСГМ в стенке бронхиолы. А – контрольная и экспериментальная (с ателектазами) группы на 14-ые сутки. В- результаты на 7-ые и 14-ые сутки эксперимента при наличии ателектазов

сутки показали, что при наличии ателектазов ПСГМ в интрапульмонарных участках составил 27,0% ($P < 0,0001$), а в субплевральных участках – 25,6% при ($P < 0,0001$), (Рисунок 7). Следует отметить, что участие дополнительных факторов, влияющих на степень лимитирования просвета воздухопроводящих путей было также подтверждено построением

регрессионной модели ($AUC=0,92$; $R^2 = 0.46$).

К 50-м суткам эксперимента число регистрируемых ателектазов не превысило значений, наблюдаемых на 14-е сутки. Отношение показателя общей площади ателектаза к общей площади кардиальной доли правого лёгкого несколько снизилось и составило 17%.

На тотальных срезах наблюдали ослабление расстройств кровообращения, стихание интерстициального отека и нарастание диффузных изменений образцов легочной ткани, что совпадает с данными, полученными McKleroy W. et al., 2018, Nguyen T.K. et al., 2021. При биохимическом исследовании на фоне увеличения общего содержания фосфолипидов сурфактанта отмечены невысокие показатели фосфатидилглицерина, кардиолипина и фосфатидилэтаноламинов. Эти изменения сочетались с гиперплазией булавовидных клеток, идентифицируемых при электронной микроскопии (Рисунок 8).

Спектры, полученные при раман-спектроскопическом исследовании, имели отличную от предыдущих периодов, двугорбую форму, обусловленную флуоресценцией флавинадениндинуклеотида и гемоглобина (Рисунок 9), появление которых обычно характерно для активизации процессов тканевого дыхания и ангиогенеза (Александров Н.С. и соавт., 2017).

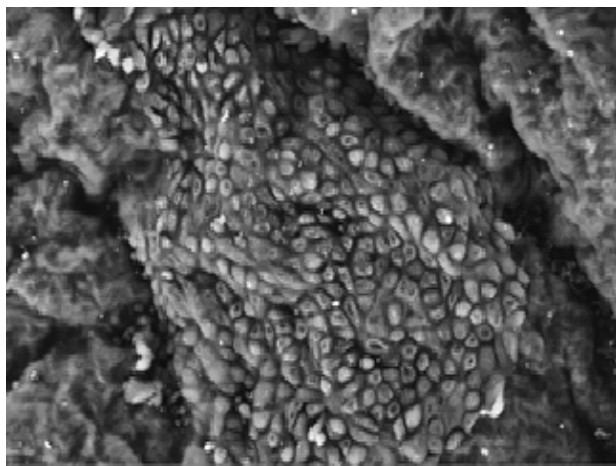


Рисунок 8 - РИПЛ 4 период. Гиперплазия булавовидных клеток эпителиальной выстилки бронхиолы. СЭМ $\times 1500$

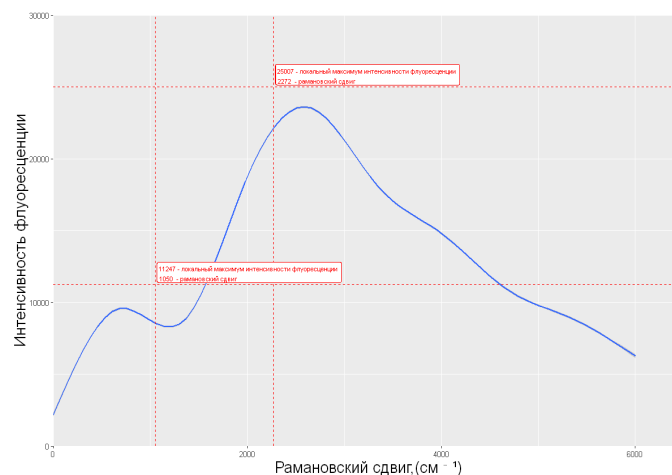


Рисунок 9 - РИПЛ, 4 период. Первый локальный максимум обусловлен флуоресценцией флавинадениндинуклеотида (ФАД), второй – гемоглобина

Особенностью изучения ателектазов в клинике является то, что образцы легочной паренхимы с реализовавшимися ателектазами стали доступными для морфологического изучения лишь после наступления летального исхода и проведения секции, иногда спустя довольно значительное время после их диагностирования и окончания лучевого воздействия с лечебной целью. При этом все исследованные случаи были разделены по временному признаку: результаты до 1 года после облучения (3 случая), в течение 2 лет (5 случаев) и отдаленные сроки (20 случаев).

Результаты морфометрического исследования показали, что в зависимости от времени, прошедшего после облучения грудной клетки по поводу рака молочной железы и возникновения ателектаза, изменения в лёгких характеризовались существенным увеличением доли безвоздушных участков (Рисунок 10), утолщением межальвеолярных перегородок и уменьшением площади альвеол, и отсутствием существенных изменений в воздухопроводящих

путях, включая лимитирование их просвета (Рисунок 11). В отличие от экспериментального спектры образцов клинического материала имели

Рисунок 10 - Доля безвоздушных участков в исследуемых фрагментах лёгких пациентов с РМЖ в различные сроки после обнаружения ателектазов

Рисунок 11 - Результаты морфометрии секционного материала, срок от 12 до 24 после диагностирования ателектаза в сравнении с контролем. А – толщина МАП В – ПА, С – ПЭВ, D – ПСГМ. Е-доля безвоздушных участков.

При этом, обтурационный механизм, как и в нашем исследовании может не играть существенной роли в их возникновении и развитии, а

Заключение

Проведенное исследование по изучению особенностей ателектазов при радиационно-индуцированном повреждении легких в клинике и эксперименте, подтвердило ведущую роль дефицита сурфактанта, оксидативного стресса, деструкции эндотелиоцитов и альвеолоцитов II типа в их возникновении и развитии. Понимание существа инициальных изменений открывает перспективы не только их профилактики, но и патогенетического таргетирования при лечении больных с опухолями грудной и внутригрудной локализаций. Раман-спектроскопическое исследование, применяемое для диагностики и оценки процессов, происходящих в различных биологических объектах, позволяет на основании анализа спектров легочной ткани оценить изменения, характерные для формирующихся ателектазов, что получило подтверждение и в нашем исследовании.

ВЫВОДЫ

1. В результате однократного локального рентгеновского облучения в дозе 12 Гр после непродолжительного латентного периода в лёгких лабораторных животных формируются альтеративные изменения эндотелиоцитов и альвеолоцитов I и II типов, уменьшение на 20% суммарного содержания фосфолипидов легочного сурфактанта.

2. При радиоиндуцированном воздействии в эксперименте первоначально возникающие субплевральные ателектазы являются сурфактант-зависимыми, монофакторными, поскольку прочие изменения в паренхиме, строме и воздухопроводящих путях, не играют статистически значимой роли. Формирующиеся в дальнейшем интрапульмонарные ателектазы являются многофакторными, развивающимися на фоне сохраняющегося качественного дефицита фосфолипидов сурфактанта и реализации гипоксического и обтурационного механизмов.

3. В основе обтурационного механизма, играющего ведущую роль в возникновении и прогрессировании интрапульмонарных ателектазов, при

радиационно-индуцированном повреждении лёгких, лежит существенное лимитирование просвета бронхиол за счет сокращения гладких миоцитов до 27% (контроль 18,2%), увеличения высоты до 0,029 μm (контроль 0,025 μm) и площади 20,5 μm^2 (контроль 16,5 μm^2) эпителиальной выстилки бронхиол и формирования серозно-слизистого экссудата.

4. Морфогенез ателектазов завершается, с одной стороны, развитием фиброателектазов, что проявляется увеличением доли безвоздушных участков от 62,2% до 78,3% (контроль 47,0%) и, с другой стороны, развитием перифокальной компенсаторной эмфиземы по периферии, что проявляется увеличением площади просвета альвеол к 50 суткам эксперимента в среднем до 702 μm^2 по сравнению с контролем (640 μm^2)

5. Ателектазы, формирующиеся у лиц неимеющих признаков легочной патологии, страдающих раком молочной железы и получающих лучевое лечение, часто реализуются сочетанно. При этом, обтурационный механизм не играет существенной роли в их возникновении и развитии, а первостепенное значение имеет персистенция оксидативного стресса, выражающаяся в доминировании активных форм кислорода и сопряженных с ним расстройствами кровообращения, гипоксией и дефицитом сурфактанта.

6. Раман-спектроскопическое исследование, применяемое для диагностики и оценки процессов, происходящих в лёгочной ткани при развитии ателектазов, позволяет на основании анализа получаемых спектров идентифицировать изменения, составляющие сущность каждого периода морфогенеза (оксидативный стресс, альтеративные изменения, расстройства кровообращения и т.д.).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Учитывая определяющий характер дефицита сурфактанта для возникновения и развития ателектазов легкого представляется целесообразным рекомендовать его применение с целью профилактики последних, предусмотрев его введение после лучевого воздействия с целью исключения потерь

сурфактанта, возникающих в результате радиолиза фосфолипидов и иных его составляющих под действием ионизирующего излучения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

1. Морфологическая характеристика эндотелиальной дисфункции при радиоиндуцированной патологии легких в эксперименте и ее модификация препаратом легочного сурфактанта / Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, Е.М. Малышева, **С.Е. Тимофеев**, Н.В. Жарков, А.А. Сейлиев, О.А. Розенберг // **Медицинская наука и образование Урала.** – 2019. -Том 20, №4 (100). – С.46-53.

2. Оксидативный стресс и эндотелиальная дисфункция в развитии экспериментального радиоиндуцированного повреждения легких и их коррекция препаратом легочного сурфактанта / Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, Е.М. Малышева, **С.Е. Тимофеев**, В.И. Кукушкин, Н.В. Жарков, О.А. Розенберг // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2020. – Т. 9 (1). – С. 35-42
<https://doi.org/10.18499/2225-7357-2020-9-1-35-42>

3. Морфогенез ателектазов легких при экспериментальном радиоиндуцированном воздействии / Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, Е.М. Малышева, **С.Е. Тимофеев**, Е.А. Старцева, О.А. Розенберг // **Клиническая и экспериментальная морфология.** – 2020. – Т. 9, № 1. - С. 30-39. DOI: 10.31088/cem2020.9.1.30-39

Другие публикации

1. Сравнительная иммуногистохимическая и спектроскопическая характеристика оксидативного стресса и эндотелиальной дисфункции при радиоиндуцированном повреждении легких (РИПЛ) в эксперименте / Е.М.

Малышева, Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, **С.Е. Тимофеев**, В.И. Кукушкин // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии : Сб. науч. тр. – Москва, 12-13 ноября 2020. – С. 99-100.

2. Особенности лучевого повреждения лёгких в эксперименте / **С.Е. Тимофеев**, Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, Е.М. Малышева, О.А. Розенберг // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии : Сб. науч. тр. – Москва, 12-13 ноября 2020. – С. 171-172

3. **S. Timofeev**, Y. Kirillov, I. Chernov, Y. Malysheva, O. Rozenberg. The role of pulmonary collapse in radiation-induced lung injury //Virchows Arch 2020, 477 (Suppl 1), 1–390, S125. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02938-x>.

4. Y. Malysheva, Y. Kirillov, I. Chernov, **S. Timofeev**, V.Kukushkin. The oxidative stress and endothelial dysfunction in radiation-induced lung injury //Virchows Arch 2020, 477 (Suppl 1), 1–390, S126. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02938-x>.

5. **S. Timofeev**, Y. Kirillov, O. Rosenberg. Morphometry the lungs atelectatic areas in radiation-induced injury //Virchows Arch 479 (Suppl 1), 2021, 1–320, S164. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03157-8>

6. **S. Timofeev**, Y. Kirillov, O. Rosenberg. A modular approach to the study of the morphogenesis of atelectasis in radio-induced lung injury // Virchows Arch 479 (Suppl 1), 2021, 1–320, S300. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03157-8>