



## РОЛЬ РИБОНУКЛЕАЗ В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА

М. А. Матлакова

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

*Введение.* Адекватная оценка патогенеза и особенностей течения острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), а также поиск новых методов лечения данной патологии – актуальные задачи современной медицины.

*Цель исследования.* Выявление влияния ферментов рибонуклеаз (РНКаЗ) на патологический процесс ОРДС.

*Материал и методы.* Для моделирования ОРДС у лабораторных крыс Wistar были использованы липополисахарид *Escherichia Coli* и *Pseudomonas Aeruginosa*, раствор тромбопластин-кальциевой смеси и рекомбинантный белок RNASE2 человека.

*Результаты.* Полученные модели ОРДС характеризовались стойкими значимыми нарушениями гемостаза и повышением уровня цитокинов; фрагмент рибонуклеазы человека оказал воздействие на изменение уровня тромбинового времени, активированного частичного тромбопластинового времени и интерлейкина-6 в исследуемых моделях.

*Выводы.* Изменения, наблюдаемые у опытных животных, свидетельствуют о влиянии рибонуклеаз на течение патологического процесса ОРДС, а представленные модели позволяют оценить взаимосвязь выбранных факторов с разными исходами.

**Ключевые слова:** острый респираторный дистресс-синдром, экспериментальное исследование, крысы Wistar, рибонуклеазы, гемостаз.

*Для цитирования:* Матлакова, М. А. Роль рибонуклеаз в иммунопатогенезе экспериментального острого респираторного дистресс-синдрома / М. А. Матлакова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2023. Т. 21, № 4. С. 364-367. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2023-21-4-364-367>.

### Введение

Усовершенствование эффективности терапии острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) – серьезная задача для ученых, проводящих фундаментальные и прикладные исследования [1], поэтому необходимо создавать экспериментальные модели данного состояния с подробным описанием патологических проявлений. Разработанные модели используются для внедрения новых подходов к лечению и обновления существующих рекомендаций. В настоящее время в литературе представлены многочисленные клинические исследования, которые были посвящены изучению клинической картины, течения и прогноза ОРДС [2, 3]. В то же время, несмотря на многочисленные рекомендации по лечению данного заболевания, до сих пор не существует единого мнения о том, какая терапия наиболее эффективна.

Рибонуклеаза – перспективное лекарственное средство с ограниченными показаниями для применения [4, 5]. Наиболее изучены протеолитические и противовирусные эффекты рибонуклеазы [6].

**Цель исследования** – выявление влияния ферментов рибонуклеаз на патологический процесс ОРДС на модели с использованием лабораторных животных.

### Материал и методы

Для исследований использовали крыс-самцов Wistar возрастом 10-12 недель и массой тела в момент включения в эксперимент 200-220 г. Все манипуляции выполнялись у животных, фиксированных эластичным зондом, наркоти-

зированных тиопенталом натрия («Синтез», РФ) из расчета 45 мг/кг массы животного. Моделирование ОРДС осуществлялось с использованием бактериального липополисахарида (ЛПС) *E. Coli* (Sigma-Aldrich, производство – Израиль) и *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma-Aldrich, производство – Швеция). Для исследований использовался фрагмент рекомбинантного белка RNASE2 человека с N-концевой меткой слияния (Prestige Antigens™, APREST83346-100UL, Sigma-Aldrich Co. LLC, страна происхождения – Швеция) в растворенном виде во флаконе в концентрации 3,9 мг/мл в объеме 100 мкл. Антигенная последовательность пептида: QFTWAQWFETQHINMTSQQCTNAMQV. С целью внутрилегочного введения ЛПС и рекомбинантного белка RNASE2 человека у наркотизированных животных в 6-8 межреберье треугольника между лопаткой и грудным отделом позвоночника инсулиновым шприцем объемом 1 мл выполнялась инъекция 50 мкл приготовленного раствора липополисахарида (1,25 мг/животное) или 60 мкл липополисахарида с раствором пептида рибонуклеазы (0,3 мг/кг). Для введения ЛПС и рибонуклеазы использовано правое легкое животного. Раствор тромбопластин-кальциевой смеси («Технология-Стандарт», Российская Федерация) вводили в боковую вену хвоста в дозе 20 мг/кг. Исследования включали группу отрицательного контроля и четыре экспериментальные модели. Модель 1: животным выполняли внутрилегочную инъекцию ЛПС *E. Coli* и выводили из опыта через 5 часов. Модель 2: животным выполняли

внутрилегочную инъекцию ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* и внутривенную инъекцию тромбопластин-кальциевой смеси, выводили из опыта через 5 часов. Модель 3: животным выполняли внутрилегочную инъекцию ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* и внутривенную инъекцию тромбопластин-кальциевой смеси, выводили из опыта через 20 часов. Модель 4: животным выполняли внутрилегочную инъекцию ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*, пептида RNASE2 и внутривенную инъекцию тромбопластин-кальциевой смеси, выводили из опыта через 5 часов.

У животных исследовались масса тела, а также легочный коэффициент (ЛК) – относительная масса легких. Исследования показателей гемостаза (тромбинового времени (ТВ), протромбинового времени (ПВ), активированного парци-

ального тромбопластинового времени (АПТВ)) выполнены с использованием наборов производства «Технология-Стандарт». Для исследований методом иммуноферментного анализа (ИФА) использовалась сыворотка крови, применялись наборы ИФА для количественного определения у крыс D-димера, интерлейкина-6 (IL-6) и фактора некроза опухоли – альфа (TNF- $\alpha$ ) (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., КНР). Статистическая обработка и анализ результатов исследования осуществлялись с использованием табличного редактора Microsoft Office Excel и пакета программного обеспечения Statistica for Windows version 10. Для принятия решений о различии между выборками использовали р-уровень значимости. Если полученное эмпирическое значение  $p \leq 0,05$ , то нулевую гипотезу отвергали, ха-

**Таблица** – Сравнение легочного коэффициента, показателей гемостаза, системной концентрации цитокинов у крыс контрольной и опытных групп

**Table** – Comparison of lung coefficient, hemostasis indices, systemic concentration of cytokines in rats of the control and experimental groups

Показатель	Экспериментальная группа крыс				
	Отрицательный контроль (0,9% раствор NaCl, 5 часов)	Модель 1 (1,25 мг ЛПС <i>E. coli</i> O111:B4, 5 часов)	Модель 2 (1,25 мг ЛПС <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 20 мг/кг тромбопластин-кальциевой смеси, 5 часов)	Модель 3 (1,875 мг ЛПС <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 20 мг/кг тромбопластин-кальциевой смеси, 20 часов)	Модель 4 (1,25 мг ЛПС <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 20 мг/кг тромбопластин-кальциевой смеси, RNASE2 5 часов)
Масса, г	212,1±1,4 (n=28)	212,7±1,8 (n=18, p=0,7980)	211,1±1,6 (n=20, p=0,6390)	208,0±1,5 (n=9, p=0,1156)	207,0±1,4 (n=5, p=0,1315)
Масса легких, г	1,53±0,07 (n=28)	1,54±0,05 (n=18, p=0,8897)	1,6 ±0,05 (n=20, p=0,1577)	1,62±0,04 (n=9, p=0,4748)	1,56±0,06 (n=5, p=0,8668)
ЛК, %	0,722±0,032 (n=28)	0,725 ±0,022 (n=18, p=0,9464)	0,787±0,024 (n=20, p=0,1400)	0,778±0,018 (n=9, p=0,3402)	0,753±0,034 (n=5, p=0,6927)
ТВ, с	43,9±4,4 (n=17)	43,2±9,7 (n=5, p=0,9400)	54,8±3,3 (n=20, p=0,0486)	30,4±3,2 (n=9, p=0,0481)	57,0±5,3 (n=5, p=0,1443)
ПВ, с	26,6±0,8 (n=17)	23,6±4,2 (n=5, p=0,2627)	27,1±0,6 (n=20, p=0,6197)	39,0±6,3 (n=8, p=0,0097)	52,3±7,9 (n=4, p=0,0000)
АПТВ, с	29,5±1,7 (n=22)	32,9±1,7 (n=15, p=0,1817)	27,7±1,5 (n=20, p=0,4381)	34,1±5,2 (n=9, p=0,2828)	21,3±0,8 (n=5, p=0,0372)
D-димер, нг/мл	211,8±22,7 (n=15)	415,6±21,2 (n=9, p=0,0000)	364,7±15,6 (n=20, p=0,0000)	481,1±78,9 (n=5, p=0,0002)	411,2±68,8 (n=5, p=0,0019)
IL-6, пг/мл	128,8±0,6 (n=15)	428,2±118,3 (n=20, p=0,0031)	845,2±237,8 (n=9, p=0,0139)	106,7±12,4 (n=5, p=0,0475)	209,3± 67,7 (n=5, p=0,0554)
TNF- $\alpha$ , пг/мл	15,6±2,0 (n=25)	32,4±5,5 (n=19, p=0,0019)	17,2±2,7 (n=16, p=0,6429)	6,0±3,3 (n=5, p=0,0050)	35,9±22,70 (n=5, p=0,0425)

Примечание – в скобках указаны: n – количество исследованных животных, p – уровень статистической значимости изменения показателей животных по сравнению с отрицательным контролем по результатам использования статистического критерия Стьюдента

рактические распределения считали разными.

Исследования с использованием лабораторных животных были одобрены комитетом по биомедицинской этике БГМУ и выполнялись в соответствии с международными и принятыми в Республике Беларусь принципами и требованиями биоэтики (протокол № 12 от 12.04.2022).

### *Результаты и обсуждение*

Клинические наблюдения после внутрилегочного введения во всех опытных группах выявили у животных одышку, единичные судороги и тремор. В течение 20 часов наблюдения у животных были также отмечены заторможенность, вялость, периодически крысы принимали боковое положение. У животных группы отрицательного контроля не выявлялась одышка, но фиксировалась заторможенность. Крысы также периодически принимали боковое положение.

Макроскопический контроль легких крыс после введения ЛПС обоих типов позволил выявить морфологические изменения органа. Были зафиксированы диффузные кровоизлияния по всей паренхиме легких и воспалительный процесс, захватывающий преимущественно правое легкое. Прочие органы не были подвержены изменениям.

В процессе исследований проведен сравнительный анализ показателей легочного коэффициента, показателей гемостаза, системной концентрации цитокинов у крыс, приведенных в таблице, для опытных групп отрицательный контроль – модель 1, отрицательный контроль – модель 2, отрицательный контроль – модель 3, отрицательный контроль – модель 4, а также определена статистическая значимость (р-значение) изменения данных показателей опытных групп (модель 1, модель 2, модель 3, модель 4) по сравнению с отрицательным контролем с использованием статистического критерия Стьюдента для независимых выборок. При значимом различии сравниваемых показателей соответствующие им р-значения в таблице выделены жирным шрифтом.

Выявленные статистически значимые изменения в показателях ТВ, ПВ и D-димера свидетельствуют о том, что для всех моделей, представленных в данном исследовании, характерны значительные нарушения в системе гемостаза как через 5 часов, так и через 20 часов после введения. При одновременном введении раствора бактериального липополисахарида и тромбопла-

стин-кальциевой смеси воспалительный процесс начинается с коагуляции как иммунного, так и сосудистого типа, о чем говорит повышение уровня цитокинов. На фоне этого процесса в тканях возникают дистрофические и некротические изменения. В противопоставление моделям с внутрилегочным введением только бактериального ЛПС, модель с внутрилегочным введением рибонуклеазы характеризуется:

1) отсутствием статистически значимых различий между контрольной и опытной группами в показателе ТВ; значимым увеличением значения показателя ПВ; значимым укорочением АЧТВ;

2) снижением уровня IL-6 в сыворотке крови;

3) сохранением высокой концентрации TNF- $\alpha$ .

Из комплекса зафиксированных изменений в показателях гемостаза можно сделать вывод об активации внутреннего (факторы VIII, IX, XI) и подавлении внешнего (фактор III, ТФ) пути свертывания крови; активация конечного этапа свертывания, в свою очередь, была соизмерима с аналогичным показателем в контрольной группе. Высокий уровень D-димера в модели с лечением рибонуклеазой свидетельствует о сохранении фибринолиза при высокой концентрации TNF- $\alpha$ , обладающего прокоагулянтными свойствами и антифибринолитической активностью. Лечение РНКазой приводит к снижению концентрации IL-6, что может говорить о противовоспалительном действии рибонуклеаз.

### *Заключение*

Полученные модели ОРДС с внутрилегочным введением бактериального липополисахарида и внутривенным введением тромбопластин-кальциевой смеси характеризовались стойкими значимыми нарушениями гемостаза и повышением уровня цитокинов. Рекомбинантный белок рибонуклеазы человека 2, вводимый опытным животным вместе с ЛПС, оказывал влияние на изменение уровней тромбинового времени, активированного частичного тромбопластинового времени и концентрации интерлейкина-6 у животных в исследуемых моделях. Таким образом, изменения, наблюдаемые у опытных животных из группы с лечением РНКазой, свидетельствуют о воздействии рибонуклеаз на течение патологического процесса ОРДС. Представленные модели позволяют оценить взаимосвязь выбранных факторов с разными исходами.

### *Литература*

1. Мороз, В. В. ОРДС – патогенез и терапевтические мишени / В. В. Мороз, А. В. Власенко, А. М. Голубев // Анестезиология и реаниматология. – 2014. – Т. 59, № 4. – С. 45-52. – edn: SKHGZX.
2. Светлицкая, О. И. Сравнительная характеристика диагностических критериев и современная классификация ОРДС / О. И. Светлицкая, И. И. Канус // Экстренная медицина. – 2016. – Т. 5, № 3. – С. 353-364. – edn: WMTNFN.
3. Механизмы патогенеза, диагностика и лечение ОРДС. Часть II / А. В. Власенко [и др.] // Медицинский алфавит. – 2017. – Т. 2, № 17. – С. 10-21. – edn: ZVMMQX.
4. Еркин, А. А. Изучение бактериальных рибонуклеаз. Рибонуклеазы как альтернативный способ борьбы с вирусами / А. А. Еркин, И. Ж. Молдекова // Universum: химия и биология. – 2022. – № 6-1. – С. 16-18. – edn: NEGWYL.
5. Морозова, О. В. Новые подходы к лечению флавирусных инфекций / О. В. Морозова, Е. И. Исаева, С. О. Вязов // Вопросы вирусологии. – 2015. – Т. 60, № 6. – С. 5-9. – edn: UXLMUX.

6. Ильинская, О. Н. Рибонуклеазы как противовирусные агенты / О. Н. Ильинская, Р. Шах Махмуд // Молекулярная биология. – 2014. – Т. 48, № 5. – С. 707. – doi: 10.7868/S0026898414040053. – edn: TAJVDR.
3. Vlasenko AV, Alekseev VG, Rozenberg OA, Evdokimov EA, Kochergina VV. Mechanisms of pathogenesis, diagnosis and treatment of ARDS. Part II. *Medical Alphabet*. 2017;2(17):10-21. edn: ZVMMQX. (Russian).
1. Moroz VV, Vlasenko AV, Golubev AM. Pathogenesis and target therapy of ARDS. *Anesthesiology and Intensive Care*. 2014;59(4):45-52. edn: SKHGZX. (Russian).
4. Yerkin AA, Moldekova I. The study of bacterial ribonucleases. Ribonucleases as an alternative way to fight viruses. *Universum: himija i biologija*. 2022;(6-1):16-18. edn: NEGWYL. (Russian).
2. Svetlitskaya OI, Kanus II. Comparative characteristics of diagnostic criteria and modern classification of ARDS. *Emergency medicine*. 2016;5(3):353-364. edn: WMTNFN. (Russian).
5. Morozova OV, Isaeva EI, Vyazov SO. New approaches to the treatment of flavivirus infections. *Problems of Virology*. 2015;60(6):5-9. edn: UXLMUX. (Russian).
6. Ilyinskaya ON, Shah Mahmud R. Ribonucleases as antiviral agents. *Molecular biology*. 2014;48(5):707. doi: 10.7868/S0026898414040053. edn: TAJVDR. (Russian).

### References

## THE ROLE OF RIBONUCLEASES IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF EXPERIMENTAL ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

M. A. Matlakova

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

*Background.* An adequate assessment of the pathogenesis and course of acute respiratory distress syndrome (ARDS), as well as the search for new methods of treating this pathology, are urgent tasks of modern medicine.

*The aim of the study was to reveal the influence of ribonuclease enzymes (RNases) on the pathological process of ARDS.*

*Material and methods.* Lipopolysaccharide from *Escherichia Coli* and *Pseudomonas Aeruginosa*, thromboplastin-calcium mixture solution, and recombinant human RNASE2 protein were used to simulate ARDS in laboratory Wistar rats.

*Results.* The resulting models of ARDS were characterized by persistent significant hemostasis disorders and an increase in the level of cytokines; a fragment of human ribonuclease had an impact on the change in the levels of thrombin time, activated partial thromboplastin time and interleukin-6 in the studied models.

*Conclusions.* The changes observed in experimental animals indicate the influence of ribonucleases on the course of the pathological process in ARDS, and the presented models allow us to evaluate the relationship of the selected factors with various outcomes.

**Keywords:** acute respiratory distress syndrome, experimental study, Wistar rats, ribonucleases, hemostasis.

**For citation:** Matlakova MA. The role of ribonucleases in the immunopathogenesis of experimental acute respiratory distress syndrome. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2023;21(4):364-367. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2023-21-4-364-367>.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** В рамках ГПНИ 4 «Трансляционная медицина» по подпрограмме 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки» 1.25 «Установить роль рибонуклеазных энзиматических механизмов в предотвращении иммунотромбоза при экспериментальном остром респираторном дистресс-синдроме у лабораторных животных».

**Financing.** Scientific Research Program 4 «Translational medicine» under subprogram 4.2 "Fundamental aspects of medical science" 1.25 "To establish the role of ribonuclease enzymatic mechanisms in the prevention of immunothrombosis in experimental acute respiratory distress syndrome in laboratory animals."

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом.  
**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee.

**Об авторе / About the author**

Матлакова Мария Александровна / Matlakova Maria, e-mail: matlakovam1998@gmail.com, ORCID: 0000-0003-2467-2402

Поступила / Received: 18.04.2023

Принята к публикации / Accepted for publication: 06.07.2023