

Зміни експресії та локалізації ангіотензинперетворювального ензиму-2 при гострій експериментальній бронхопневмонії

Д.С. Зяблицев¹, О.О. Дядик², А.О. Тихомиров³, М.М. Цветкова¹, С.В. Зяблицев¹

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ;

²Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, Київ;

³Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, Київ; e-mail: denis898@ukr.net

Коронавірус (SARS-CoV-2) проникає до клітини завдяки зв'язуванню з трансмембранним глікопротеїном – ангіотензинперетворювальним ензимом-2 (ACE2), який експресується на поверхні бронхіального та альвеолярного епітелію. У зв'язку з цим метою нашого дослідження стало визначення змін експресії та тканинної локалізації ACE2 у моделі гострого бронхолегеневого запалення. Останнє відтворювали ендотрахеальним введенням стороннього тіла (капронової нитки) та розчину ліпополісахариду (50 мкл у дозі 12,5 мг/кг) на тлі системного його введення протягом 2 діб до операції (250 мг/кг). З використанням моноклональних антитіл проти ACE2 проводили імуногістохімічне та імуноблотингове дослідження. В експерименті відтворена гостра ексудативно-геморагічна бронхопневмонія із розвитком дифузного прогресуючого фіброзу легень з летальністю 36% тварин. Гостре ексудативне запалення супроводжувалося повним пригніченням експресії ACE2 у епітеліоцитах бронхів та суттєвим її зниженням у альвеолоцитах II порядку. При розвитку проліферативної стадії бронхопневмонії вміст ACE2 суттєво зростає і надалі залишався на початкових значеннях. Отримані результати дали змогу припустити існування зв'язку між особливостями кількісних змін вмісту ACE2 у бронхолегеновому епітелії та хвилеподібним перебігом запального процесу при інфекції SARS-CoV-2.

Ключові слова: ангіотензинперетворювальний ензим-2; бронхопневмонія; експериментальна модель; запалення.

ВСТУП

Глобальна світова пандемія, що спричинена коронавірусом 2-го типу (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 – SARS-CoV-2), ставить питання про патогенез гострого легеневого вірусного пошкодження [1]. Визначальними патологічними процесами у бронхолегеневій системі є розвиток ексудативного запалення, що може ускладнюватися гострим респіраторним дистрес-синдромом (ГРДС), а згодом – дифузним фіброзом легень [2]. У зв'язку з цим існує необхідність розробки адекватних експериментальних моделей, які б відтворювали такі процеси та дали змогу дослідити основні механізми їхнього розвитку [3, 4].

© Д.С. Зяблицев, О.О. Дядик, А.О. Тихомиров, М.М. Цветкова, С.В. Зяблицев

Гостре бронхолегеневе запалення можна викликати введенням стороннього тіла (капронової нитки) у трахею [5]. Як показали наші попередні дослідження, така модель дає можливість отримати повільне бронхолегеневе ексудативно-проліферативне запалення з розвитком дифузного фіброзу легень на 4-му тижні спостереження, але ГРДС при цьому не розвивається [6].

Відомо, що індуктором гострого ексудативно-альтеративного запалення легень є бактеріальний ліпополісахарид [7]. Його ендотрахеальне введення шурам викликало гостре ексудативне легеневе запалення, набряк та активну перибронхіальну та периваскулярну лейкоцитарну інфільтрацію [8]. Ефекти ліпополісахариду схожі з такими

при розвитку SARS-CoV-2-асоційованої пневмонії та включають системну запальну відповідь, гарячку, цитокінову бурю, що реалізується через активацію Toll-подібних рецепторів (TLR-4), підвищення експресії генів прозапальних цитокінів і прооксидантних протеїнів та транскрипційного ядерного фактора κB (NF- κB) [9].

SARS-CoV-2 проникає до клітини завдяки зв'язуванню з трансмембранним глікопротеїном – ангіотензинперетворювальним ензимом-2 (ACE2), який конвертує ангіотензин I на неактивний ангіотензин 1–9, а ангіотензин II – на ангіотензин 1–7 [10, 11]. Фізіологічне значення таких перетворень полягає у протидії надмірним ефектам ангіотензину II (вазоконстрикції, активації запалення і утворення прозапальних цитокінів, проліферації фібробластів і фіброзу, апоптозу альвеолярного епітелію) [12, 13].

Наші попередні дослідження на моделі бронхопневмонії з введенням стороннього тіла у трахею показали, що ексудативна фаза гострого запалення супроводжувалася пригніченням експресії ACE2 у бронхіальному епітелії та альвеолоцитах II порядку [14]. При розвитку стадій проліферації та фіброзування експресія ACE2 відновлювалася. Такі фазні зсуви експресії ACE2 можуть зумовлювати хвилеподібний рецидивуючий перебіг коронавірусної хвороби – відновлення експресії ACE2 на клітинах-мішенях при згасанні гострого запалення може сприяти їх новому інфікуванню вірусом.

Метою нашого дослідження було визначення змін вмісту та особливостей тканинної локалізації ACE2 у моделі ліпополісахаридіндукованого гострого ексудативно-альтеративного бронхолегеневого запалення.

МЕТОДИКА

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Директиви 2010/63 ЄС із захисту тварин, Гельсінкської декларації (2008) та вимогами Закону України «Про захист тварин

від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009). Тварин тримали в умовах віварію на стандартному раціоні.

Гостру експериментальну бронхопневмонію моделювали ендотрахеальним введенням стороннього тіла (капронової нитки), що дає змогу отримати повільний розвиток запального процесу з дифузним фіброзом паренхіми легень через 4 тиж [6]. Для загострення патологічного процесу додатково до введення капронової нитки щурам лінії Вістар ($n = 50$) масою 180–190 г за 1 та 2 доби до оперативного втручання внутрішньоочеревинно вводили розчин ліпополісахариду (пірогенал, «МЕДГАМАЛ») у дозі 250 мг/кг. З використанням анестезії тіопенталом (50 мг/кг у 0,5 мл фізіологічного розчину внутрішньоочеревинно) по середній лінії шиї робили розріз шкіри довжиною до 1 см та за допомогою атравматичних судинних затискачів типу Москіт мобілізували трахею. На наступному етапі у трахею ін'єкційною голкою вводили стерильну капронову нитку довжиною 2,5 см та товщиною 0,2 мм на глибину 2,5 см, а інсуліновою – 50 мкл розчину ліпополісахариду (12,5 мг/кг маси тіла). Операційну рану обробляли 10%-м розчином бетадіну та зашивали. До контрольної групи включили 5 псевдооперованих тварин (трахею проколювали, але капронову нитку та розчин ліпополісахариду не вводили).

Протягом одного місяця після операції визначали загальний стан тварин, ректальну температуру, ступінь ціанозу, наявність задишки, частоту дихання, аускультативні прояви. На 1, 3, 5, 7, 14 та 21-шу добу спостереження по 5 тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом. Розтинали грудну порожнину, легені відсепаровували. Шматочки тканини легені з різних ділянок фіксували в 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну (рН 7,4) протягом 24–36 год, а потім заливали в парафін. З парафінових блоків на ротаційному мікротомі НМ 325 (“Thermo Shandon”, Англія) виготовляли

серійні гістологічні зрізи товщиною 2-3 мкм. Імуногістохімічне дослідження (ІГХД) проводили з використанням моноклональних антитіл проти ACE2 (anti-ACE2; clone 4G5.1; “Sigma-Aldrich” MABN59, replaces MAB5676), виробництва “EMD Millipore Corporation” (США) на адгезивних скельцях Super Frost Plus (“Menzel”, Німеччина). Для високо-температурної обробки епітопів антигенів використовували цитратний буфер (pH 6,0), EDTA-буфер (pH 8,0); застосовували систему детекції UltraVision Quanto HRP, хромоген диметиламінобензол Quanto (“Thermo Fisher Scientific”, США). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів “Zeiss” (Німеччина) з системою обробки результатів “Axio Imager. A2” при збільшенні об’єктивів у 5, 10, 20, 40 разів, біокулярної насадки у 1,5 раза та окуляра у 10 разів з камерами ERc 5s, “Carl Zeiss” Primo Star та AxioCam 105 color та світлооптичного мікроскопа “Olympus BX 40”, додатково обладнаним цифровою камерою “Olympus C3030-ADU” і програмним забезпеченням “Olympus DP-Soft”.

Вміст ACE2 у лізатах тканини легень визначали методом імуноблотингу. Зразки легеневої тканини витримували у скрапленому азоті, подрібнювали та гомогенізували у 50 ммоль тріс-НСl-буфері (pH 7,4) з додаванням інгібіторів фосфатаз та протеаз (Pierce Protease and Phosphatase inhibitor, “ThermoScientific”, США, #A32961) і проводили додаткову дезінтеграцію ультразвуком. Після центрифугування в супернатанті вимірювали концентрацію загального протеїну спектрофотометрично [15]. Електрофорез проводили у 8%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) [16] у камері для вертикального гель-електрофорезу (“BioRad”, США). Концентрування зразків здійснювали при напрузі 30–35 В (15–18 мА), розділення – 45–50 В (30–35 мА). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за

допомогою електроблоту, використовуючи буферний розчин, що містив 0,025 моль тріс-НСl, 0,192 моль гліцину та 25% метанолу [17]. Мембрани блокували у 5%-му розчині знежиреного сухого молока у забуференому фізіологічному розчині (PBS), після чого інкубували з моноклональними антитілами до ACE2. Кролячі антитіла до актину (“Abcam”, США, кат. № ab20272) використовували для його детекції як контролю нанесення протеїну. Після первинної інкубації мембрани відмивали та обробляли антивидовими вторинними антитілами, кон’югованими з пероксидазою хрому. Імунореактивні зони візуалізували методом підсиленої хемілюмінесценції (ECL) з подальшою ауторадіографією на рентгенівських плівках [18]. Напівкількісний аналіз проводили денситометрично, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, “Nonlinear Inc”, США). Молекулярну масу протеїнів у зразках визначали, порівнюючи їхню міграцію з розташуванням на нітроцелюлозній мембрані забарвлених маркерів Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (“ThermoScientific”, Литва, кат. № 26619) у діапазоні 10–230 кДа. Результати імуноблот-аналізу вмісту ACE2 виражали у відсотках від контрольного значення оптичної густини відповідної поліпептидної зони (в умовних одиницях) на блотограмах, нормованої за вмістом актину в кожному зразку (ACE2/актин).

Для статистичного аналізу застосовували програмне забезпечення Statistica 10 (“StatSoft, Inc.”, США). Описову статистику проводили з розрахунком середніх (М) та їхніх стандартних відхилень (SD). Вибіркові середні порівнювали із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA), вірогідними вважали значення $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ендотрахеальне введення капронової нитки та розчину ліпополісахариду, як правило,

супроводжувалося декількома судомними вдихами та видихами, частішанням дихання. Вже через 10–15 хв при аускультатії вислуховувалися наростаючі вологі хрипи. Дихання ставало утрудненим, із залученням м'язів грудної клітини. Після закінчення дії наркозу (30–45 хв після операції) тварини лишалися млявими, мали низьку рухливу активність, посилювався ціаноз. Зазвичай, вислуховувалися дистальні вологі хрипи, дихання було частим, спастичним. Деякі тварини після операції не приходили до тями, була відмічена гіпо- або арефлексія, відсутність больової чутливості, брадикард. На фоні таких змін протягом першої години після операції 5 тварин загинуло (10,0%).

Згодом патологічний процес у легенях розвивався досить бурхливо. Вже на 1-шу добу після операції всі тварини мали виражені хрипи, котрі було чути на відстані; дихання часте (до 96–144 рухів на хвилину), переривчасте, утруднене, з активним залученням грудних м'язів та діафрагми. Тварини демонстрували низьку рухову активність, зниження рефлексів. Наприкінці 3-ї доби загинуло ще 9 тварин (18,0%).

На 3–5-ту добу загальний стан тварин погіршувався, чітко вислуховувався симптом крепітації легенів, спостерігався виражений ціаноз. Після 5-ї доби стан тварин стабілізувався, зникали вологі хрипи, дихання ставало жорстким, переривчастим, ціаноз зберігався і на 12–14-ту добу, ще 4 тварин (8,0%) загинули. Отже, загальна летальність протягом експерименту становила 36,0%.

Введення ліпополісахариду протягом 2 діб до оперативного втручання призводило до стійкої гіпертермії ($37,8\text{--}38,8^{\circ}\text{C}$), яка зберігалася впродовж усього періоду спостереження (21 доба). Ректальна температура тварин до першого введення ліпополісахариду була $37,0 \pm 3,9^{\circ}\text{C}$, а вже через 15 хв – $38,2 \pm 2,6^{\circ}\text{C}$ ($P = 0,02$). Протягом усього спостереження температура тварин суттєво від останнього значення не відрізнялася ($P > 0,05$).

ІГХД у контрольній групі показало позитивну експресію ACE2 (рис. 1). Специфічне забарвлення спостерігали на апікальній поверхні епітелію бронхів у вигляді облямівки (у вигляді суцільної облямівки). У паренхімі легень та перибронхіально позитивне забарвлення відмічено в частині альвеолоцитів II порядку,

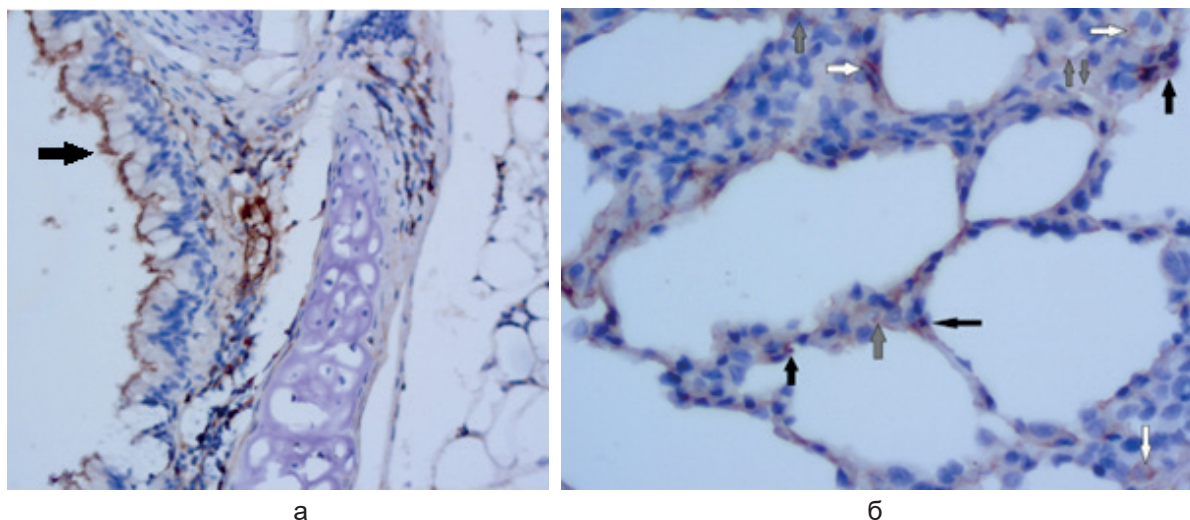


Рис. 1. Мікропрепарати легені щура контрольної групи. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження ACE2. а – стінка бронха; позитивне забарвлення апікальної поверхні епітелію у вигляді облямівки (показано стрілкою), в інтерстиції – позитивно забарвлені мононуклеарні клітини; збільшення у 200 разів; б – паренхіма легень; позитивне забарвлення альвеолоцитів II порядку (чорні стрілки), мононуклеарних клітин інтерстицію (білі стрілки), ендотелію (сірі стрілки); збільшення у 400 разів

в інтерстиції – в моноцитах та ендотелії судин різного калібру.

На 1-шу добу відмічена емфізематозна дилатація альвеол зі стоншенням та розривами міжальвеолярних перетинок, гіперплазія альвеолоцитів II порядку (рис. 2, а), у судинах – повнокрів'я та екстазія венул, вогнищевий мікротромбоз. У паренхімі легень виявлялися одиничні імунопозитивні моноцити і макрофагі (див. рис. 2, б). Суцільна облямівка апікальної поверхні бронхів, яка була характерна для контрольної групи, зникла.

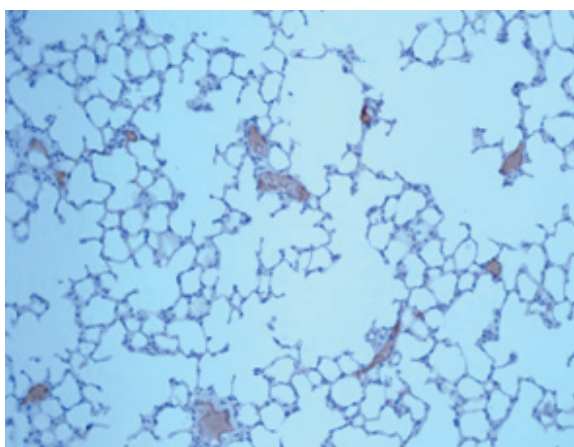
Загалом, за результатами ІГХД рівень імунозабарвлення ACE2 при візуальній оцінці його інтенсивності був суттєво знижений, що збігалось з результатами імуноблот-аналізу (рис. 3) – вдвічі порівняно з контролем ($P = 0,003$). Через 3 доби у легенях з'являлись осередки ателектазів, виражений інтерстиціальний набряк з лімфоцитарно-нейтрофільною інфільтрацією; у альвеолах ексудат серозно-геморагічного характеру із домішками лейкоцитів; реактивна гіперплазія перибронхіальних лімфоїдних фолікулів. Інтенсивність імуноспецифічного забарвлення (див. рис. 3, б) відновлювалася до контрольних значень ($P = 0,104$). При цьому позитивну реакцію проявляли скупчення моноцитарних

клітин у паренхімі легень, альвеолоцити II порядку, апікальна поверхня бронхіального епітелію.

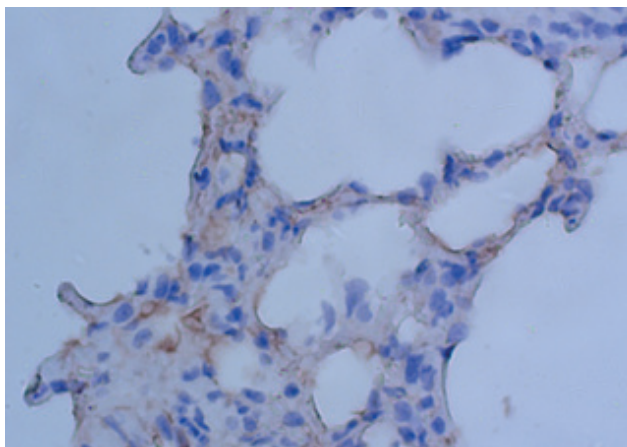
На 5-ту добу у паренхімі легень ділянки ателектазу чергувалися з ділянками емфіземи (рис. 4, а). Міжальвеолярні перетинки в зонах ателектазу набрякли, інфільтровані лімфоцитами і нейтрофілами, імунопозитивними макрофагами; у альвеолах – серозно-геморагічний ексудат з домішками гною. Відмічено гіперплазію імунопозитивних епітеліоцитів II порядку (див. рис. 4, б). Вміст ACE2 за результатами денситометричного дослідження істотно збільшувався порівняно з контролем – у 1,9 раза ($P < 0,001$).

На 7-му добу наростали явища дистелектазів з повним перекриттям альвеолярних просвітів. У паренхімі легень з'являлися ознаки активного фіброзування, у альвеолах – серозно-геморагічний ексудат з нитками фібрину та домішкою нейтрофілів. Вміст ACE2 залишався на сталому високому рівні (перевищував контроль у 1,6 раза; $P = 0,003$), що за результатами ІГХД було характерно для всіх клітин, що його експресують: епітелію бронхів, інтерстиціальних макрофагів, ендотеліоцитів та альвеолоцитів II порядку.

На 14-ту добу у легенях відзначено зони



а



б

Рис. 2. Мікропрепарати легені щура на 1-шу добу експериментальної бронхопневмонії. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження ACE2. а – дилатація альвеол, стоншення і розриви міжальвеолярних перетинок, повнокрів'я судин, екстазія венул з мікротромбозом; збільшення у 100 разів; б – одиничні імунопозитивні клітини у міжальвеолярних перетинках; збільшення у 400 разів

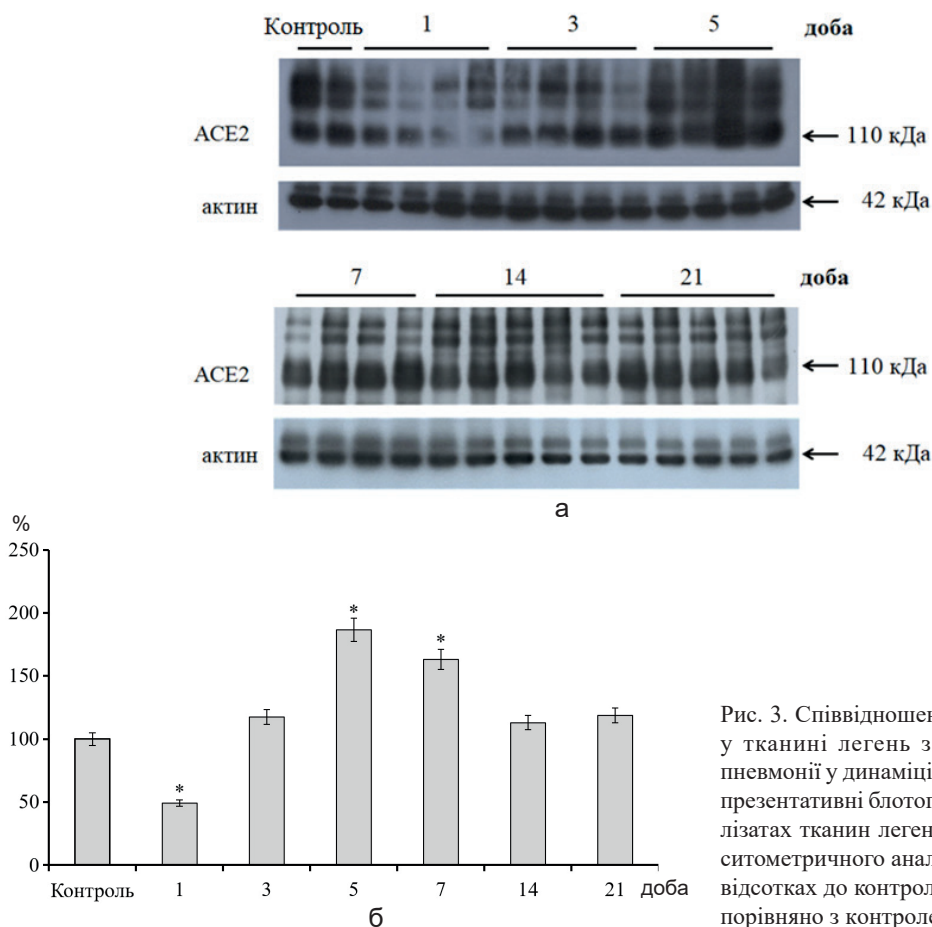


Рис. 3. Співвідношення вмісту ACE2/актин у тканині легень за експериментальної пневмонії у динаміці спостереження; а – репрезентативні блотограми ACE2 та актину у лізатах тканин легень; б – результати денситометричного аналізу блотограм ACE2 (у відсотках до контрольного рівня); * $P < 0,05$ порівняно з контролем

щільного фіброзування – карніфікації; дифузно, вздовж судинних структур, наявні безперервні поля хронічного продуктивного запалення. Паренхіма активно інфільтрована імунопозитивними клітинами, відмічено специфічне забарвлення ендотеліоцитів; фіброblastи імунопозитивного забарвлення не мали (рис. 5, а). Стінка бронхів активно інфільтрована імунопозитивними моноцитами, різко виражений фіброз середнього шару, дистрофія та атрофія епітелію з імунопозитивною облямівкою, виражена гіперплазія імунонегативних келихоподібних клітин.

Такі зміни на 21-шу добу були ще більш значними. Це вказувало на розвиток хронічної пневмонії з вираженим фіброзом паренхіми і склерозуванням судинних структур. У паренхімі легень, частіше перибронхіально, виявлялися скупчення імунопозитивних

клітин, апікальна поверхня бронхіального епітелію мала інтенсивне імунопозитивне забарвлення (див. рис. 5, б). За результатами денситометричного аналізу блотограм вміст ACE2 на 14-ту і 21-шу добу не відрізнявся від контролю ($P = 0,80$ та $P = 0,150$ відповідно).

Таким чином, ендотрахеальне введення стороннього тіла (капронової нитки) та розчину ліпополісахариду на тлі системного введення останнього відтворювало гострий ексудативного-геморагічний запальний процес у легенях. Водночас формувалося гіперімунне запалення з розвитком ГРДС та геморагічна пневмонія (на 3-тю добу). З 5-ї доби відбувалось активне фіброзування бронхів та паренхіми легень, що на 14-ту добу супроводжувалося розвитком дифузного легеневого фіброзу.

Клінічна та морфологічна картина проявів

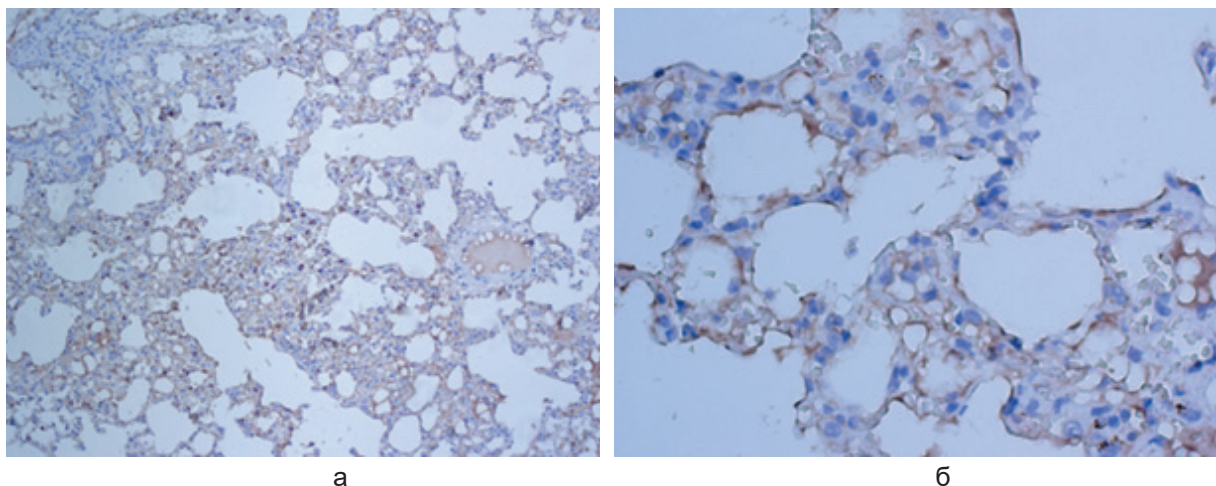


Рис. 4. Мікропрепарати легені щура на 5-ту добу експериментальної бронхопневмонії. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження вмісту ACE2. а – ділянки ателектазу і емфіземи, набряк міжальвеолярних перетинок, активна інфільтрація імунопозитивними клітинами; збільшення у 200 разів; б – активна інфільтрація міжальвеолярних перетинок імунопозитивними клітинами, гіперплазія альвеолоцитів II порядку з високою експресією ACE2; збільшення у 400 разів

експериментальної бронхопневмонії давала змогу провести певну аналогію з перебігом SARS-CoV-2-асоційованої пневмонії у людей, коли вже на ранній стадії розвивається дифузне альвеолярне пошкодження з руйнуванням паренхіми, капілярним витоком та ГРДС [19]. Саме дифузний набряк легень є головною причиною смертності у цей період хвороби

внаслідок гострої дихальної недостатності [1, 20]. До 7-ї доби гостра ексудативна стадія запалення переходить до проліферативної з розвитком дифузного фіброзу паренхіми легень [19].

За результатами наших досліджень методом імуногістохімії, імунопозитивне забарвлення ACE2 мали апікальна поверхня

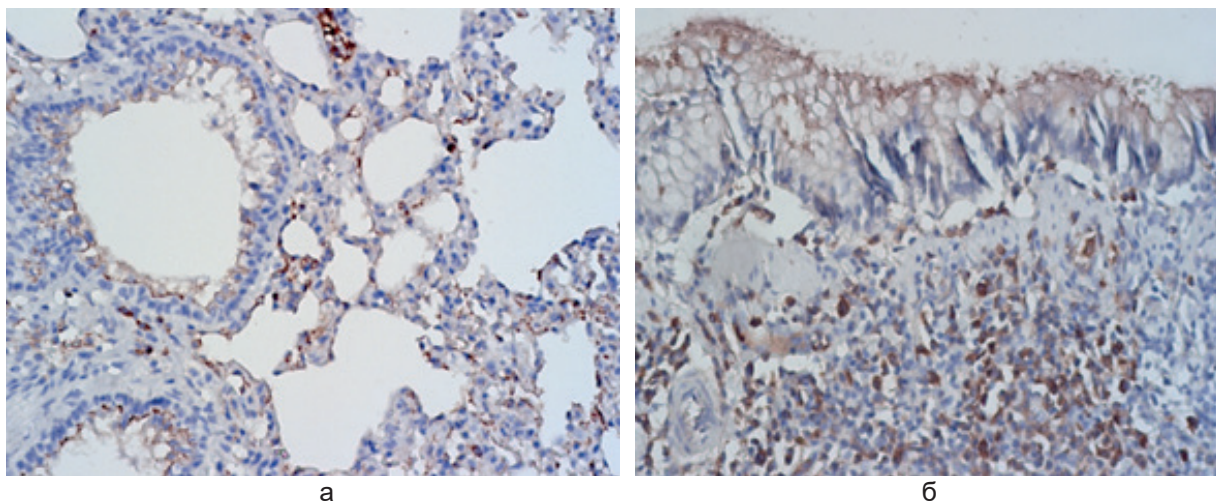


Рис. 5. Мікропрепарати легені щура на 14-ту добу експериментальної бронхопневмонії. Репрезентативні результати імуногістохімічного дослідження ACE2. а – ущільнення тканини легень, активне продуктивне запалення, інфільтрація імунопозитивними клітинами, фібробласти без специфічного забарвлення; висока інтенсивність специфічного забарвлення апікальної поверхні епітелію бронхів; збільшення у 400 разів; б – 21-ша доба експериментальної бронхопневмонії; перибронхіальний фолікул з великою кількістю імунопозитивних клітин, активна гіперплазія імунонегативних келихоподібних клітин, імунопозитивне забарвлення апікальної поверхні бронхіального епітелію; збільшення у 400 разів

бронхіального епітелію у вигляді суцільної облямівки, поодинокі моноцитарні клітини в інтерстиції, частина альвеолоцитів II порядку та судинний ендотелій. Ці результати збігалися з даними, отриманими у інших експериментальних дослідженнях [21, 22].

Локалізація ACE2 у людини відповідає отриманим нами експериментальним результатам – максимальною вона була в епітелії верхніх дихальних шляхів, що створює умови для інфікування SARS-CoV-2 [23]. Активне імуноспецифічне забарвлення апікальної поверхні епітелію дихальних шляхів та його прямий зв'язок з коронавірусною хворобою було показано й в дослідженні Ziegler і співавт. [24]. Для інфікування альвеолоцитів II порядку також має значення високий рівень експресії ACE2, що зумовлює активну реплікацію вірусу в альвеолах. Щодо ендотеліоцитів капілярів, то наявність у них активної експресії ACE2 може спричинювати гематогенний шлях розповсюдження вірусу. Високий рівень експресії був у диференційованих клітинах, на відміну від низькодиференційованих.

У наших дослідженнях протягом 1-ї доби розвивалося гостре ексудативне запалення з ознаками гіперімунної реакції, що супроводжувалося зникненням ACE2 на апікальній поверхні бронхіального епітелію. Суттєве зниження рівня імунозабарвлення ACE2 на блотограмах підтвердило цю тенденцію. За результатами ІГХД експресія на поверхні альвеолоцитів II порядку була слабо інтенсивною, але не втрачалася повністю. Інтенсивність ACE2-специфічного забарвлення суттєво не знижувалася в імунних клітинах, що активно інфільтрували міжальвеолярні перетинки.

У людей, які померли від коронавірусної хвороби, була виявлена наявність ACE2 у альвеолоцитах II порядку та у новоутворених інтерстиціальних капілярах, у пошкоджені ендотелії [25]. Дифузне пошкодження ендотелію сприяє тромбофілії [26]. За результатами нашого дослідження, гостре запалення

знижує, але не виключає експресію ACE2 у ендотеліальних клітинах інтерстицію легень.

Високий рівень експресії ACE2 в імунних клітинах легень (нейтрофілах, макрофагах, Т-лімфоцитах) відмічено у багатьох дослідженнях [21, 23]. Її фізіологічна роль у цих клітинах полягає в утворенні ангіотензину 1-7, який зменшує експресію прозапальних інтерлейкінів (ІЛ) – фактора некрозу пухлин α і ІЛ-6, та збільшує експресію проти-запальних цитокінів (ІЛ-4 і ІЛ-10) [27]. Отже, зменшення експресії ACE2 протягом гострої фази ексудативного запалення може погіршувати природний протизапальний потенціал.

У модельних експериментальних дослідженнях було показано, що коронавірус та його шипоподібний S-протеїн сприяють зниженню рівня експресії ACE2 та погіршують гостру легеневу недостатність [28]. Як виявилось у нашому дослідженні, гостре запалення здатне спричинити суттєве зменшення рівня експресії ACE2, навіть за відсутності вірусу або його антигенів.

Таким чином, пригнічення синтезу ACE2, що характерно для гострого періоду запалення, має негативне значення, оскільки зміщує рівновагу у ренін-ангіотензиновій системі в бік некерованих прозапальних реакцій. З іншого боку, втрата ACE2 клітинами епітелію бронхів може обмежувати чутливість тканин до вірусу. Клінічні дослідження однозначно показали хвилеподібний перебіг хвороби [1, 13, 20], що цілком може бути пов'язано зі зниженням експресії ACE2 під час гострого запалення та її подальшим відновленням. У нашому дослідженні таке відновлення показано при переході від стадії ексудативного до проліферативного запалення (на 3–7-му добу). Інтенсивне імуноспецифічне забарвлення було визначено на апікальній поверхні епітелію бронхів, альвеолоцитах II порядку, ендотелії судин, імунних клітинах інтерстицію. Щодо причини відновлення експресії ACE2, то такою могла бути гіпоксія [29]. Показано, що

в епітеліальних клітинах малих дихальних шляхів та альвеолоцитах II порядку людей з тривалим перебігом коронавірусної хвороби, мРНК ACE2 та його експресія індукувалися гіпоксією.

Таким чином, результати нашого дослідження показали фазні зміни вмісту ACE2 за розвитку гострого бронхолегеневого запалення. Протягом ексудативної фази синтез ACE2 припинявся в епітелії бронхів та істотно зменшувався у тканині легень. З початком проліферативної стадії вміст ACE2 значно зростає, а при розвитку фіброзу легень зменшувався до початкового рівня. Це свідчило про наявність зв'язку між експресією ACE2 та гострим запальним процесом. Відновлення експресії ACE2 може зумовлювати рецидивуючий перебіг інфекційного процесу, оскільки, ймовірно, сприятиме новій хвилі інфікування вірусом.

ВИСНОВКИ

1. Введення стороннього тіла (капронової нитки) до трахеї та розчину ліпополісахариду (системно та ендотрахеально) дало змогу створити експериментальну модель гострої ексудативно-геморагічної бронхопневмонії з розвитком гострого респіраторного дистрес-синдрому (вже через годину) та дифузного прогресуючого фіброзу легень (з 5-ї доби), що супроводжувалося летальністю 36% тварин.

2. Гостре ексудативне запалення протягом 1-ї доби за результатами імуногістохімічного дослідження та імуноблотингу супроводжувалося повним пригніченням експресії ACE2 у епітеліоцитах бронхів та суттєвим її зниженням у альвеолоцитах II порядку. При розвитку проліферативної стадії бронхопневмонії (на 5–7-му добу) вміст ACE2 суттєво зростає, а надалі залишався на початковому рівні.

3. За результатами імуногістохімічного дослідження на всіх стадіях запального процесу високий вміст ACE2 мали тканинні

моноцити і макрофагі, тоді як фіброblastи і келихоподібні клітини імуноспецифічного забарвлення не мали.

4. Отримані експериментальні результати щодо існування зв'язку між особливостями кількісних змін вмісту ACE2 у бронхолегеновому епітелії та перебігом запального процесу, що може мати значення при інфекції SARS-CoV-2.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

D.S. Ziablitshev¹, O.O. Dyadik², A.O. Tikhomirov³, M.M. Tsvetkova¹, S.V. Ziablitshev¹

CHANGES IN THE CONTENT AND FEATURES OF LOCALIZATION OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME-2 (ACE2) IN ACUTE EXPERIMENTAL BRONCHOPNEUMONIA

¹ O. Bogomolets National Medical University, Kyiv;

² Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv;

³ Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: denis898@ukr.net

Coronavirus (SARS-CoV-2) enters the cell by binding to a transmembrane glycoprotein, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2), which is expressed on the surface of the bronchial and alveolar epithelium. In this regard, the aim of this study was to determine changes in the content and characteristics of tissue localization of ACE2 in the model of acute bronchopulmonary inflammation. The latter was modeled by endotracheal injection of a foreign body (Capron thread) and a solution of lipopolysaccharide (LPS; 50 µl at a dose of 12.5 mg/kg) against the background of systemic administration of LPS for two days before surgery (250 mg/kg). ACE2 localization and quantity were evaluated by immunohistochemical and western blot assays with the use of a specific monoclonal antibody. The experiment reproduced acute exudative-hemorrhagic bronchopneumonia with the development of diffuse progressive pulmonary fibrosis with lethality in 36% of animals. Acute exudative inflammation was accompanied by complete inhibition of ACE2 expression in bronchial epitheliocytes and its significant decrease in alveolocytes type II. With the development of the proliferative stage of bronchopneumonia, the level of ACE2 was restored,

subsequently remaining without significant changes. The obtained experimental data suggest the existence of a relationship between the features of quantitative changes in the ACE2 level in the bronchopulmonary epithelium and the undulating course of the inflammatory process during SARS-CoV-2 infection. Key words: angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2); bronchopneumonia; experimental model; inflammation.

REFERENCES

- Cai A, McClafferty B, Benson J, Ramgobin D, Kalayanamitra R, Shahid Z, Groff A, Aggarwal CS, et al. COVID-19: Catastrophic cause of acute lung injury. *S D Med*. 2020 Jun;73(6):252-60.
- Polidoro RB, Hagan RS, de Santis Santiago R, Schmidt NW. Overview: systemic inflammatory response derived from lung injury caused by SARS-CoV-2 infection explains severe outcomes in COVID-19. *Front Immunol*. 2020;11:1626.
- Winkler MS, Skirecki T, Brunkhorst FM, Cajander S, Cavaillon JM, Ferrer R, et al. Bridging animal and clinical research during SARS-CoV-2 pandemic: A new-old challenge. *EBioMedicine*. 2021;66:103291.
- Rosa R B, Dantas WM, do Nascimento J, da Silva MV, de Oliveira RN, Pena LJ. *In vitro* and *in vivo* models for studying SARS-CoV-2, the etiological agent responsible for COVID-19 pandemic. *Viruses*. 2021;13(3):379.
- Kubyshev AV, Novikov NU, Birkun AA old, Nesterov EN. Experimental model of acute lung injury. *Tavr Med Biol Bull*. 2012;15(2;3):122-4. [Russian].
- Zyablitshev SV, Pensky PYu, Litvinets ML, Kovalova AV, Salamaha AA. Dynamics of morphological manifestations of the experimental acute aspiration bronchopneumonia development. *Morphologia*. 2021; 15(1):48-59. [Ukrainian].
- Regeda-Furdychko MM, Regeda SM, Furdychko LO. Derangement of some immune values in blood at late period of experimental pneumonia and thio-triazolin correction. *Odessa Med J*. 2016;155(3): 9-11. [Ukrainian].
- Fan Y, Wang J, Feng Z, Cao K, Xu H, Liu J. Pinitol attenuates LPS-induced pneumonia in experimental animals: Possible role via inhibition of the TLR-4 and NF- κ B/I κ B α signaling cascade pathway. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021;35(1):e22622.
- Yelins'ka AM, Shvaykovs'ka OO, Kostenko VO. Influence of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate on the production of reactive oxygen and nitrogen species in tissues of periodontium and salivary glands in rats exposed to *Salmonella typhi* lipopolisaccharide. *Fiziol Zh*. 2018;64(5):63-9. [Ukrainian].
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020;181:271-80.
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581:215-20.
- Wiese O, Zemlin AE, Pillay TS. Molecules in pathogenesis: angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). *J Clin Pathol*. 2021 May;74(5):285-90.
- Liu MY, Zheng B, Zhang Y, Li JP. Role and mechanism of angiotensin-converting enzyme 2 in acute lung injury in coronavirus disease 2019. *Chronic Dis Transl Med*. 2020 Jun;6(2):98-105.
- Ziablitshev DS, Dyadik OO, Khudoliy OO, Shepitko VI, Ziablitshev SV. Expression of angiotensin-converting enzyme-2 in lung tissues in experimental bronchopneumonia. *World Med Biol*. 2021;4(78):208-13.
- Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*. 1990;182:50-68.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(9):4350-4.
- Alegria-Schaffer A. Western blotting using chemiluminescent substrates. *Methods Enzymol*. 2014;541:251-9.
- Suster S, Moran AC. Biopsy interpretation of the lung. 1st ed. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer. 2013.
- Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020 Mar 17;323(11):1061-9.
- Descamps G, Verset L, Trelcat A, Hopkins C, Lechien JR, Journe F, Saussez S. ACE2 protein landscape in the head and neck region: The conundrum of SARS-CoV-2 infection. *Biology (Basel)*. 2020 Aug 18;9(8):235.
- Sato T, Ueha R, Goto T, Yamauchi A, Kondo K, Yamasoba T. Expression of ACE2 and TMPRSS2 proteins in the upper and lower aerodigestive tracts of rats: Implications on COVID 19 infections. *NALaryngoscope*. 2021;131:E932-9.
- Ortiz ME, Thurman A, Pezzulo AA, Leidinger MR, Klesney-Tait JA, Karp PH, et al. Heterogeneous expression of the SARS-Coronavirus-2 receptor ACE2 in the human respiratory tract. *EBioMedicine*. 2020 Oct;60:102976.
- Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol*. 2005 Dec;79(23):14614-21.
- Damiani S, Fiorentino M, De Palma A, Foschini MP, Lazzarotto T, Gabrielli L, et al. Pathological post-mortem findings in lungs infected with SARS-CoV-2. *J Pathol*. 2021 Jan;253(1):31-40.
- Cipolloni L, Sessa F, Bertozzi G, Baldari B, Cantatore S, Testi R, et al. Preliminary post-mortem COVID-19

- evidence of endothelial injury and factor VIII hyperexpression. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Aug 9;10(8):575.
27. Pan H, Huang W, Wang Z, Ren F, Luo L, Zhou J, Tian M, Tang L. The ACE2-Ang-(17)-Mas axis modulates M1/M2 macrophage polarization to relieve CLP-induced inflammation via TLR4-mediated NF- κ B and MAPK pathways. *J Inflamm Res*. 2021 May 20;14:2045-60.
28. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Yang P, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005 Aug;11(8):875-9.
29. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbano IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell*. 2020 May 28;181(5):1016-35.e19.

*Матеріал надійшов
до редакції 17.01.2022*