

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК [57+61]:616-091:57.033:616.24.-004:613.648.4:539.1.047

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА
У РАБОТНИКОВ, ПОДВЕРГШИХСЯ
ПРОФЕССИОНАЛЬНОМУ α -ОБЛУЧЕНИЮ**

© 2024 г. Г. В. Сычугов¹, Т. В. Азизова^{2,*}, С. В. Осовец², Е. Л. Казачков¹,
Е. С. Григорьева², А. Г. Сычугов¹

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

²Южно-уральский институт биофизики
Федерального медико-биологического агентства, Озёрск, Россия

*E-mail: clinic@subi.su

Поступила в редакцию 29.05.2023 г.

После доработки 03.02.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Цель настоящего исследования — поиск морфологических особенностей радиационно-индуцированного пневмофиброза при сравнении с легочным фиброзом другого генеза, используя биологические образцы ткани легкого работников, подвергшихся воздействию внутреннего α -облучения. Морфологические характеристики пневмофиброза изучены на аутопсийных биологических образцах ткани легкого 56 работников с установленным при жизни диагнозом плутониевого пневмофиброза, 34 работников с пневмофиброзом другого генеза (в исходе хронических воспалительных заболеваний легких) и 35 работников без клинической легочной патологии (контроль). При этом суммарные поглощенные в легких дозы внешнего γ -излучения статистически значимо не различались между изучаемыми группами, а суммарные поглощенные в легких дозы внутреннего α -излучения были значительно выше у работников с плутониевым пневмофиброзом. Для определения элементов внеклеточного матрикса были использованы моно- и поликлональные меченные антитела против коллагенов типов I, IV и V. Кроме того, для оценки системы регуляции метаболизма внеклеточного матрикса были использованы антитела против матриксных металлопротеиназ MMP-2, MMP-9, тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ TIMP-1, TIMP-2. В результате проведенного исследования обнаружены качественные и количественные морфологические особенности плутониевого пневмофиброза при сравнении с пневмофиброзом другого генеза, позволяющие заключить, что плутониевый пневмофиброз — это особый тип пневмофиброза, при котором отмечены особенности локализации и архитектоники очагов фиброза легочной ткани, нарушения содержания коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон легочной стромы. Анализ показал, что гиперпродукция коллагена типа V играет ключевую роль в развитии плутониевого пневмофиброза. Кроме этого, в развитии пневмофиброза важную роль играет нарушение баланса между экспрессией MMP и их ингибиторов.

Ключевые слова: профессиональное облучение, α -излучение, легочный фиброз, внеклеточный матрикс, ПО “Маяк”

DOI: 10.31857/S0869803124020073, **EDN:** NBCDMJ

Легочный фиброз, развивающийся у работников, подвергшихся профессиональному воздействию α -активных аэрозолей трансураниевых элементов (ЛФР), рассматривается как детерминированный эффект (тканевая реакция) [1–5]. Первый случай ЛФР был зарегистрирован в когорте работников Производственного объединения (ПО) “Маяк” [6].

Регистр ЛФР, включающий 188 случаев, подробно описан Т.В. Азизовой и соавт. [5]. Показано, что частота ЛФР в когорте работников ПО “Маяк” значительно возрастает с увеличением суммарной поглощенной в легких дозы внутреннего α -излучения

от инкорпорированного плутония-239, и не зависит от дозы внешнего γ -излучения. В работах, в которых представлены результаты исследований эффектов профессионального облучения у работников ПО “Маяк” [5, 7–11], авторы отмечают, что основными преимуществами этой когорты являются длительный период наблюдения, индивидуальные измеренные дозы внешнего и внутреннего облучения, полная медицинская информация за весь период наблюдения и наличие биопрепаратов различных органов и тканей, собранных у 30% членов когорты (в том числе 35.2% работников с установленным диагнозом

ЛФР), которые хранятся в Радиобиологическом репозитории тканей человека (РРТЧ) «Южно-Уральского института биофизики» Федерального медико-биологического агентства [12]. В последние десятилетия опубликовано много работ, посвященных когортным исследованиям работников ПО «Маяк». В этих работах представлены доказательства связи раковых и нераковых эффектов как с внешним γ -облучением, так и с внутренним α -облучением [8–11, 13, 14]. Показаны статистически значимые зависимости не только для рака легкого, но и для хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) от суммарных поглощенных в легких доз внутреннего α -облучения [8, 15, 16]. Однако механизмы радиационно-индуцированных эффектов остаются пока неясными. Целью настоящего исследования являлся поиск морфологических особенностей радиационно-индуцированного пневмофиброза при сравнении с легочным фиброзом другого генеза, используя биологические образцы ткани легкого работников, подвергшихся внутреннему альфа-облучению.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Для изучения морфологических особенностей ЛФР в РРТЧ на основе данных, содержащихся в медико-дозиметрической базе данных «Клиника» [7] идентифицированы биологические образцы ткани легкого (формалин-фиксированные парафиновые блоки (ФФПБ)) у 125 работников ПО «Маяк». Образцы были разделены на три группы: 1-ю группу составили 56 случаев с ЛФР, 2-ю группу — 34 случая с пневмофиброзом нелучевого генеза, в основном в исходе хронических воспалительных заболеваний легких (не-ЛФР); 3-ю группу — 35 случаев без легочной патологии (БЛП). Следует отметить, что все перечисленные диагнозы были установлены у работников при жизни и подтверждены после проведения аутопсийного исследования. ЛФР был диагностирован у работников, не имевших в анамнезе хронических заболеваний легких или сердца, на основании клинических симптомов и признаков, результатов физикального и рентгенологического обследований (простая рентгенография в двух проекциях и крупнофокусная рентгенография апикальной области и межреберье I–II), лабораторных исследований, исследования функции внешнего дыхания (жизненная емкость легких, мощность вдоха и выдоха, число дыхательных движений и число сердечных сокращений в минуту, диффузионная способность легких, сопротивление дыханию и др.).

Для классификации тяжести повреждения легочной паренхимы использовались критерии оценки легочного фиброза на основе шкалы Эшкрофта [17], модифицированной Хубнером [18]. Критерием включения в исследование принимался легочный фиброз 3-й степени и выше по шкале Ashcroft-Hubner. Для этой степени характерно умеренное утолщение альвеолярных или бронхиолярных стенок без явного повреждения легочной архитектоники.

Дополнительно к оценке степени выраженности легочного фиброза проводилось определение выраженности микроскопических признаков сопутствующих эмфизематозных изменений путем подсчета индекса респираторных бронхиол (ИРБ) [19]. Для этого измерялось соотношение между глубиной альвеол и поперечным сечением проводящего отдела бронхиол. Если Q — поперечное сечение респираторной бронхиолы вместе с альвеолами, X — ширина проводящего отдела, а Y — глубина альвеолы, то $Q = X + 2Y$. Отсюда ИРБ рассчитывался как

$$ИРБ = X / 2Y. \quad (1)$$

Основные характеристики изучаемых групп работников представлены в табл. 1.

Следует отметить, что суммарные поглощенные в легких дозы внешнего γ -излучения статистически значимо не различались между изучаемыми группами, а суммарные поглощенные в легких дозы внутреннего α -излучения, были значительно выше у работников с ЛФР ($p < 0.05$).

Гистологическая обработка материала

Резецированные при аутопсии фрагменты легочной ткани фиксировали в 10%-ном нейтральном буферезированном формалине 24 ч, затем заливали в парафиновые блоки [20]. Из ФФПБ легких готовили срезы толщиной 5 мкм. Для обзорной микроскопии срезы легких окрашивали гематоксилином и эозином в соответствии со стандартным протоколом [21].

Определение соединительно-тканного каркаса легочной ткани

Для определения соединительно-тканного каркаса легочной стромы и очагов пневмофиброза срезы окрашивали, используя следующие методы [21]: ван Гизона (выявление общего объема коллагеновых волокон); Гомори (выявление ретикулиновых волокон легочной стромы), Вейгерта (выявление эластических волокон легочной стромы). Для идентификации клеточных и

Таблица 1. Основные характеристики изучаемых групп работников**Table 1.** Main characteristics of the studied groups of workers

Характеристика	Группа 1 (ЛФР, $n = 56$)	Группа 2 (не-ЛФР, $n = 34$)	Группа 3 (БЛП, $n = 35$)
Доля работников, нанятых до 1960 года, абс. (%)	56 (100.00%)	34 (100.00%)	35 (100.00)
Доля работников, когда-либо работавших на радиохимическом заводе, но никогда не работавших на плутониевом заводе, абс. (%)	4 (7.14%)	20 (58.83%)	25 (71.43)
Доля работников, когда-либо работавших на плутониевом заводе, абс. (%)	52 (92.86%)	6 (17.64%)	2 (5.71)
Доля лиц с измеренной α -активностью плутония в моче, абс. (%)	49 (87.50%)	33 (97.06%)	31 (88.57)
Возраст на момент смерти, лет	60.04 \pm 9.20	63.50 \pm 10.02	59.37 \pm 6.23
Возраст на момент найма, лет Age at hire, years	27.25 \pm 6.15	28.97 \pm 6.67	25.74 \pm 4.92
Продолжительность работы, лет	24.83 \pm 7.56	24.73 \pm 6.31	28.08 \pm 7.08
Поглощенная в легком доза внешнего γ -излучения, Гр	1.27 \pm 0.62	1.49 \pm 0.72	1.46 \pm 0.70
Поглощенная в легком доза внутреннего α -излучения, Гр	5.13 \pm 4.77	0.16 \pm 0.18	0.15 \pm 0.22

Примечание. ЛФР — легочный фиброз; БЛП — без легочной патологии; *Mean \pm St. Dev* обозначает среднее значение \pm стандартное отклонение.

стромальных гликопротеинов в структурах легких проводили ШИК-реакцию с постановкой контрольных реакций, использовали альциановый синий (при pH 2.5).

Иммуногистохимическое исследование

Во всех 125 случаях было проведено морфологическое изучение биологических образцов с применением метода иммуногистохимии (ИГХ).

Для определения элементов внеклеточного матрикса (ВКМ) были использованы моно- и поликлональные меченые антитела против коллагена I типа,

коллагена IV типа, коллагена V типа. Кроме того, для оценки системы регуляции метаболизма ВКМ были использованы антитела против матриксных металлопротеиназ MMP-2, MMP-9, тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ TIMP-1, TIMP-2. Список использованных клонов антител и их разведения приведены в табл. 2.

На первом этапе срезы депарафинировали по стандартной методике: в трех сменах о-ксилола по 10 мин; в трех сменах 95%-ного этанола по 5 мин; в двух сменах дистиллированной воды по 5 мин. После депарафинирования производили ингибирование

Таблица 2. Антитела, использованные для иммуногистохимического исследования**Table 2.** Antibodies used for the immunohistochemistry examination

Антитело	Клон	Рабочее разведение	Производитель	Каталожный номер
Collagen type I	N.A.	1:100	Abbotec, USA	251221
Collagen type IV	CIV22	1:100	Cell Marque, USA	239M-16
Collagen type V	N.A.	1:100	Abbotec, USA	251202
Cytokeratin Cocktail (AE1&AE3)	AE1&AE3	1:200	Cell Marque, USA	313M-16
MMP-2	N.A.	1:250	Epitomics, USA	1842-1
MMP-9	EP1254	1:250	Epitomics, USA	2551-1
TIMP-1	N.A.	1:500	Abbotec, USA	250883
TIMP-2	N.A.	1:500	Abbotec, USA	250884

Примечание: N.A. — недоступно или были использованы поликлональные антитела.

эндогенной пероксидазы с помощью 3%-ного раствора перекиси водорода.

На втором этапе производили демаскировку антигенов путем кипячения предметных стекол с тканевыми срезами в цитратном буфере (pH — 6.0) и буфере ТРИС-ЭДТА (pH — 9.0) в течение 30 мин на водяной бане. Далее срезы охлаждали 30 мин при комнатной температуре и промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4). Для иммунного окрашивания использовали пероксидазный метод с полимерной системой детекции (Histofine® SimpleStain MAX PO MULTI, Япония). Срезы инкубировали с моно- и поликлональными антителами во влажной камере 60 мин при температуре 37°C. Во всех случаях проводили дополнительное окрашивание ядер гематоксилином Майера в течение 0.5–2 мин. Контрольные реакции выполняли без первичных специфических антител.

Цифровая визуализация и количественная морфометрическая оценка

Морфометрическое исследование проводилось в соответствии с методикой, описанной в предыдущих работах [22]. Все микропрепараты были

проанализированы двойным слепым методом. Количественная оценка результатов ИГХ была основана на микрофотографиях образцов легочной ткани, оцифрованных комплексной системой для микрофотографии, состоящей из микроскопа Carl Zeiss Axioskop 40, цифровой камеры Jenoptik ProgRes CT3 (Jenoptik Group, Германия), персонального компьютера на базе Intel® Core™ i7, программного обеспечения ProgRes CapturePro 2.5. Захват изображения был выполнен с общим увеличением $\times 200$ (10 для окуляра, 20 для объектива) и $\times 400$ (10 для окуляра, 40 для объектива) при полностью закрытой апертурной диафрагме и приподнятом конденсоре. Время экспозиция составляло 4.11 мс, изображения сохранялись в виде jpeg-файлов с разрешением 1024 \times 768 пикселей.

Изображения паренхимы легкого были отобраны случайным образом. Участки, содержащие дефекты тканей, дефекты окрашивания и артефакты, исключались. В каждом случае было захвачено не менее 10 полей изображений среза. Морфометрические оценки гистологических и ИГХ наблюдений были выполнены для каждого из 10 полей зрения с большим увеличением (площадь поля 0,25 мм²) [23].

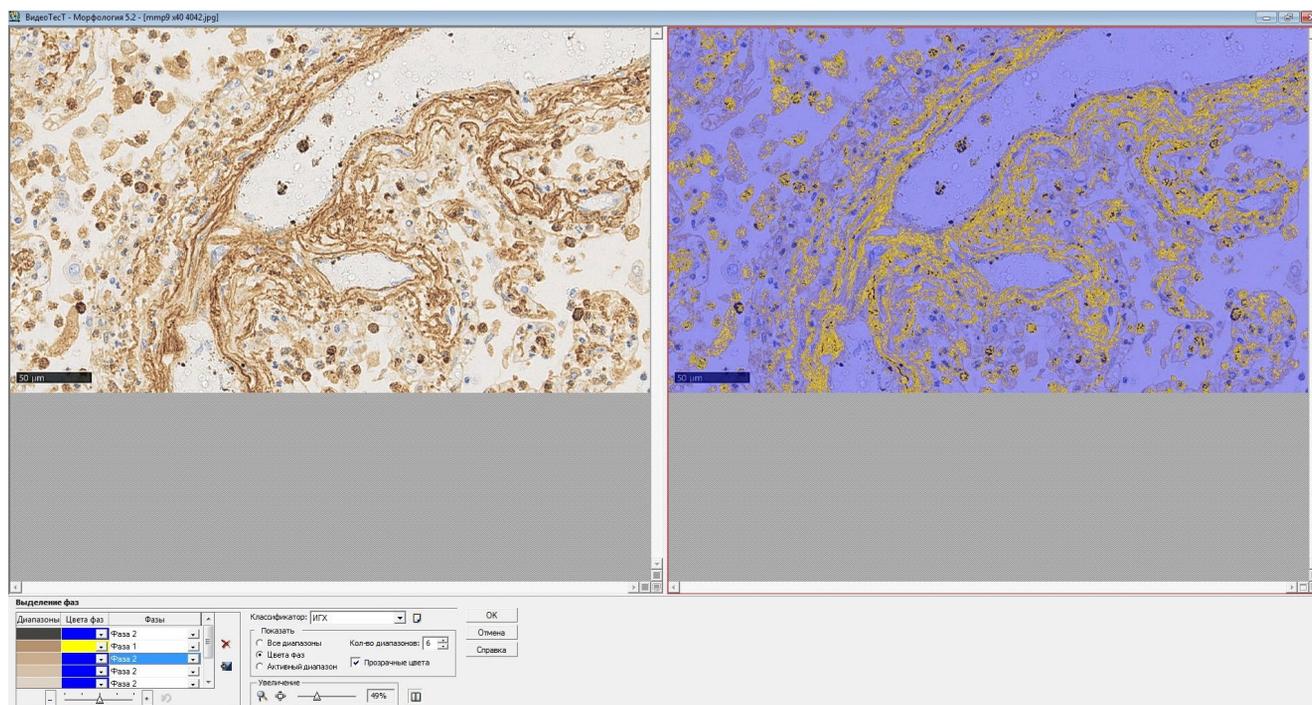


Рис. 1. Использование псевдоцветных масок над изображениями, подчеркивающими экспрессию MMP-9 в эндотелии сосудов и волокнистых элементах легочной стромы, для количественного определения содержания металлопротеиназы в срезе легочной ткани.

Fig. 1. The use of pseudocolor masks above images highlighting MMP-9 expression in vessel endothelium and lung fiber components of the lung stroma for quantification of metalloproteinase content in a lung tissue section.

Таким образом, были обработаны образцы легочной ткани всех 125 доноров.

Анализ цифровых изображений использовался для количественной оценки морфологических изменений в ткани легкого. Количественное исследование проводили с помощью программы компьютерного анализа изображений “Морфология 5.1” (ВидеоТест, Россия). Окрашенные структуры (коллагеновые, ретикулярные и эластические волокна, а также продукты окрашивания ИГХ реакций) автоматически классифицировались программой на 10 каналов в зависимости от цвета и интенсивности окрашивания. После классификации на исследуемые структуры накладывались псевдоцветные маски (рис. 1) [22].

Относительную плотность изучаемых структур рассчитывали по отношению к общей площади исследуемого кадра ($\text{мкм}^2/\text{мкм}^2$), аналогично ранее описанной в [24] методике, выраженную в объемных процентах (об. %).

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием пакета прикладных программ “STATISTICA”. В расчетах использовали метод наименьших квадратов для определения параметров нелинейных моделей [25, 26]. Для аппроксимации эмпирических данных использовали модель Вейбулла [27].

Распределение положительных результатов окрашивания исследуемых элементов соединительного каркаса легочной стромы и очагов пневмофиброза, а также внеклеточного матрикса (в объемных процентах от общего объема образца, об. %) описывали с помощью функции распределения Вейбулла — $F(x)$:

$$F(x) = 1 - \exp \left[- \ln 2 \left(\frac{X}{X_{50}} \right)^V \right], \quad (2)$$

здесь X — объемные проценты (об. %) для конкретного показателя, X_{50} — медианное значение этого показателя, V — параметр формы.

В настоящем исследовании, помимо функции распределения Вейбулла, как дополнительную количественную характеристику использовали плотность распределения — $f(x)$:

$$f(x) = \frac{V \ln 2}{X_{50}} \cdot \left(\frac{X}{X_{50}} \right)^{V-1} \cdot \exp \left[- \ln 2 \left(\frac{X}{X_{50}} \right)^V \right], \quad (3)$$

которая является производной величиной $f(x) = F'(x)$.

Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Легочный фиброз развивается в межклеточном веществе. Межклеточное вещество состоит из аморфного основного вещества (несульфатированные и сульфатированные мукополисахариды) и волокон (коллагеновых, ретикулярных и эластических).

Исследование образцов 1-й группы показало, что очаги легочного фиброза наблюдались в большем количестве случаев в периферических (“плащевых”) отделах легочной ткани. При этом очаги поражения представляли обширные очаги, сливающиеся в поля, грубой фиброзной ткани. Между описанными зонами поражения определялись прослойки сохранившейся легочной респираторной ткани. В легочной ткани всех исследованных случаев 1-й группы определялся в разной степени выраженности реактивно воспалительный инфильтрат. При обзорной микроскопии в составе инфильтрата определялись лимфоциты, плазматические клетки, сегментоядерные нейтрофилы и гистиоциты.

Участки легочного фиброза в микропрепаратах 2-й группы располагались преимущественно в легочной ткани вокруг бронхов и сосудов. Сохранившаяся респираторная ткань в большинстве препаратов 2-й группы определялась в большем объеме по сравнению с препаратами 1-й группы, а гистоархитектоника легких 2-й группы была менее изменена. Склероз в образцах 2-й группы был преимущественно ретикулярным, в то время как склероз в образцах 1-й группы был крупноочаговым. Так же, как и в 1-й группе, во 2-й группе все образцы демонстрировали полиморфноклеточный воспалительный инфильтрат различной выраженности; состав воспалительного инфильтрата в препаратах обеих групп был сходным.

В микропрепаратах 3-й группы (контроль) очагов пневмосклероза не наблюдалось. В соединительнотканной строме легкого в 3-й группе преобладали ретикулярные волокна, а не коллагеновые, как в 1-й и 2-й группах. Ретикулярный каркас стромы легких в образцах 3-й группы практически не изменялся. Клеточная инфильтрация в образцах контрольной

группы наблюдалась очень редко и содержала отдельные лимфоцитарные и гистиоцитарные элементы.

При анализе структурных компонентов соединительной ткани в препаратах обеих групп с фиброзом обнаружены статистически значимые различия почти всех исследованных показателей (за исключением экспрессии MMP-2). Общая выраженность легочного фиброза более всего определялась в микропрепаратах 1-й группы; общий объем пораженной фиброзом легочной ткани в препаратах 1-й группы был выше на 40% по сравнению с группой контроля. Выраженность сопутствующей эмфиземы по результатам измерения ИРБ наиболее представлена в группе не-ЛФР. Также в 1-й и 2-й группах выявлено снижение плотности ретикулярной стромы; однако количество ретикулярных волокон в образцах не-ЛФР было незначительно уменьшено.

Следует отметить, что повышенное содержание эластических волокон наблюдалось как в образцах ЛФР, так и в образцах не-ЛФР. Однако архитектура эластических волокон образцов была существенно изменена: эластические волокна деформировались, их толщина была неоднородной, и они

часто были утолщены. Тем не менее никаких отличительных особенностей не наблюдалось ни в структуре, ни в содержании ретикулярных/эластических волокон в образцах 1-й и 2-й групп.

Для различения соединительно-тканых и эпителиальных структурных элементов проводили ИГХ определение белков цитоскелета цитокератинов, содержащихся в клетках альвеолярного и бронхиального эпителия.

Коллагены типов I и V выявлялись преимущественно в стенках легочных сосудов, тогда как в очагах легочного фиброза преобладал коллаген типа IV (рис. 2). Уровень экспрессии коллагена типа I в образцах с фиброзом тканей исследуемых групп существенно не различался. То же самое наблюдалось для коллагена типа IV, в то время как уровень коллагена типа V был значительно выше в образцах ЛФР. В контрольной группе коллагены типов I и V обнаруживались только в стенках легочных сосудов, а коллаген типа IV можно было наблюдать в базальных мембранах альвеол и бронхиол. Статистически значимые различия между 1-й и 2-й группами обнаружены по коллагену типа V ($p < 0.05$); его объем в легочной ткани был значительно больше в образцах ЛФР по сравнению с образцами не-ЛФР.

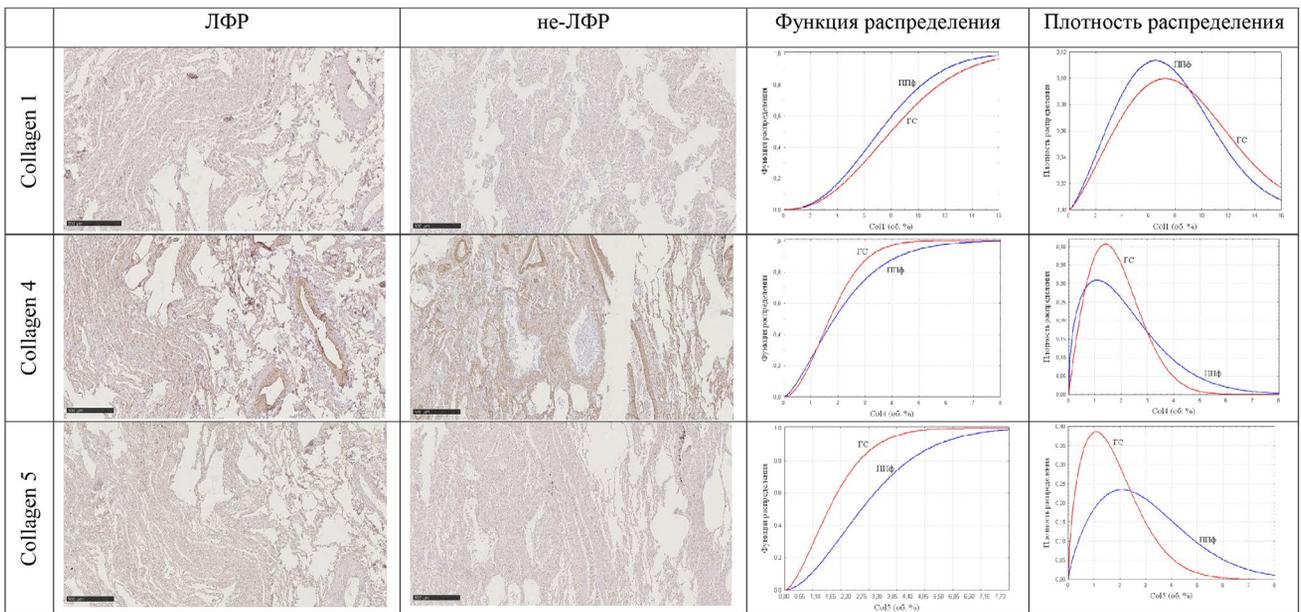


Рис. 2. Экспрессия коллагенов типов I, IV и V при ЛФР и не-ЛФР. Иммуногистохимический метод с антителами против Collagen type I, Collagen type IV, Collagen type V полимерная тест-система. Увеличение $\times 50$. Маркер 500 μm . ЛФР и ППФ — радиационный легочный фиброз, не-ЛФР — нерадикационный легочный фиброз, ГС — группа сравнения (не-ЛФР).

Fig. 2. Expression of collagens type I, IV and V in LF and non-LF specimens. Immunohistochemistry with antibodies against Collagen type I, Collagen type IV, Collagen type V, polymer test-system. Magnification $\times 50$. Scale 500 μm . LF and ППФ denotes plutonium-induced lung fibrosis, non-LF denote lung fibrosis of a different origin, ГС denotes control (no pulmonary pathology).

Статистическое сравнение 1-й и 3-й групп выявило статистически значимые различия в общем количестве коллагена, эластических волокон, эпителиальных структур и коллагена типа V (табл. 3).

Экспрессия матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9 выявлялась в клеточной цитоплазме, преимущественно в элементах воспалительного клеточного инфильтрата. Кроме этого, экспрессия металлопротеиназ в различной степени обнаруживалась в структурах ВКМ, в том числе в эндотелии сосудов и волокнистых элементах легочной стромы (рис. 3). При этом во 2-й группе содержание MMP-2 и TIMP-1 значительно пре-

обладало над содержанием соответствующих показателей 1-й группы (табл. 3).

Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ TIMP-1 и TIMP-2 выявлялись в клеточной цитоплазме клеток воспалительного инфильтрата стромы, преимущественно макрофагов и нейтрофилов, а также в структурах ВКМ. Содержание ингибиторов металлопротеиназы TIMP-2 в образцах 1-й группы превалировало над образцами 2-й группы, содержание TIMP-1, напротив, показывало обратную картину (табл. 3).

Модель Вейбулла хорошо согласовывалась с эмпирическими данными (коэффициенты детерми-

Таблица 3. Описательные характеристики образцов легочной ткани (об%) изучаемых групп

Table 3. Descriptive characteristics of lung tissue specimens (Vol%) of the studied groups

Показатель, об%	Статистические характеристики								
	<i>n</i>	Mean	Med	Min	Max	LQ	UQ	Var	St.dev
Общий объем коллагеновых волокон	56	13.185**	12.234	2.284	30.532	8.446	17.106	41.834	6.468
	34	10.984	10.837	2.999	18.745	8.798	12.999	14.550	3.814
	35	9.529	8.626	3.195	20.663	6.259	11.422	16.609	4.075
Ретикулиновые волокна	56	8.791	7.960	1.124	22.729	5.142	10.957	22.435	4.737
	34	7.195	7.525	0.644	17.651	2.266	9.992	22.397	4.732
	35	9.311	9.061	1.115	16.404	5.585	12.196	15.918	3.989
Эластические волокна	56	8.623**	7.677	2.245	21.738	5.529	10.519	20.278	4.503
	34	7.207	7.305	2.689	13.049	5.387	8.194	7.676	2.771
	35	6.514	5.991	1.680	14.690	4.326	7.990	7.800	2.793
Эпителиальные структуры	56	4.363**	3.318	0.488	14.217	2.190	6.456	9.299	3.049
	34	4.039	3.678	0.959	9.167	2.549	4.890	4.108	2.027
	35	5.627	5.608	0.716	13.194	2.689	7.681	9.695	3.114
Collagen type I	56	2.160	2.058	0.204	6.616	0.927	3.026	2.065	1.437
	34	1.851	1.777	0.364	3.674	1.106	2.529	0.905	0.951
	35	7.428	7.184	1.666	13.703	4.804	10.344	9.755	3.123
Collagen type IV	56	7.511	7.309	1.015	17.319	4.691	9.789	12.142	3.484
	34	9.000	8.121	2.454	33.131	5.297	11.244	29.911	5.469
	35	2.485	1.856	0.117	7.123	1.294	3.926	3.252	1.803
Collagen type V	56	3.099***	2.600	0.594	7.624	1.780	4.319	3.055	1.748
	34	1.891	1.415	0.347	5.574	1.013	2.618	1.544	1.243
	35	2.235	1.775	0.084	6.367	0.888	3.522	2.531	1.591
MMP-2	56	0.999*	0.998	0.091	4.356	0.247	1.518	0.924	0.961
	34	2.473	1.413	0.156	9.088	0.527	3.403	6.585	2.566
	35	1.199	0.837	0.067	4.636	0.484	1.762	1.210	1.099
MMP-9	56	5.390	4.729	1.508	15.905	3.197	7.106	8.659	2.942
	34	5.097	4.171	0.573	13.934	3.304	6.545	9.545	3.089
	35	1.036	0.857	0.068	3.571	0.525	1.466	0.582	0.763
TIMP-1	56	0.770*	0.534	0.023	3.043	0.308	1.087	0.456	0.675
	34	1.390	0.872	0.217	8.080	0.599	1.526	2.279	1.510
	35	0.746	0.645	0.176	2.031	0.384	0.913	0.255	0.504
TIMP-2	56	1.217*	0.935	0.101	3.421	0.461	1.967	0.793	0.891
	34	0.668	0.568	0.110	2.149	0.402	0.817	0.190	0.436
	35	0.695	0.614	0.056	1.815	0.314	0.872	0.244	0.494
ИРБ	56	1.274*	1.255	0.460	2.580	1.015	1.545	0.156	0.395
	34	1.500	1.410	0.610	2.600	1.190	1.850	0.221	0.470
	35	1.077	1.090	0.750	1.390	1.000	1.190	0.027	0.164

Примечание. Изучаемые группы: 1-я группа ($n = 56$), 2-я группа ($n = 34$) и 3-я группа (контроль) ($n = 35$).

* Статистически значимое различие средних ($p < 0.05$) между 1-й и 2-й группами; ** статистически значимое различие средних ($p < 0.05$) между 1-й и 3-й группами.

нации в обеих группах варьировали от 0.95 до 0.99) (табл. 4).

Анализ кумулятивных кривых показал, что параметры распределения (медиана и параметр формы) значительно различались между группами для всех исследуемых показателей, за исключением медианного объема (об. %) эпителиальных структур и параметра формы модели для коллагена типа IV (табл. 4). Особенно обращает внимание, что суммарные кривые распределения объемной доли (%) коллагена типа V, значительно различались по медианным значениям (рис. 2) и параметрам формы модели Вейбулла между образцами ЛФР и не-ЛФР.

Результаты анализа корреляционных взаимосвязей изучаемых параметров выявили в 1-й группе (ЛФР) положительную корреляционную связь умеренной степени между суммарной поглощенной в легких дозой внутреннего α -облучения и огрубением тонкого ретикулярного легочного каркаса

($r = 0.34$; $p < 0.05$), а также отрицательную корреляционную связь умеренной степени с экспрессией коллагена типа V ($r = -0.33$; $p < 0.05$). Во 2-й группе была выявлена положительная корреляционная связь умеренной степени между суммарной поглощенной в легких дозой внутреннего α -облучения и экспрессией коллагена типа V имела характер ($r = 0.53$; $p < 0.05$).

В результате регрессионного анализа выявлены статистически значимые линейные зависимости указанных выше показателей. В 1-й группе (ЛФР) выявлена статистически значимая положительная зависимость уровня экспрессии MMP-9 от уровня экспрессии TIMP-1 ($MMP-9 = (4.117 \pm 0.559) + (1.653 \pm 0.549)$). В свою очередь, экспрессия TIMP-1 прогрессивно уменьшалась с увеличением суммарной поглощенной в легких дозы внутреннего α -излучения ($TIMP1 = (1.256 \pm 0.196) - (0.385 \pm 0.139)$).

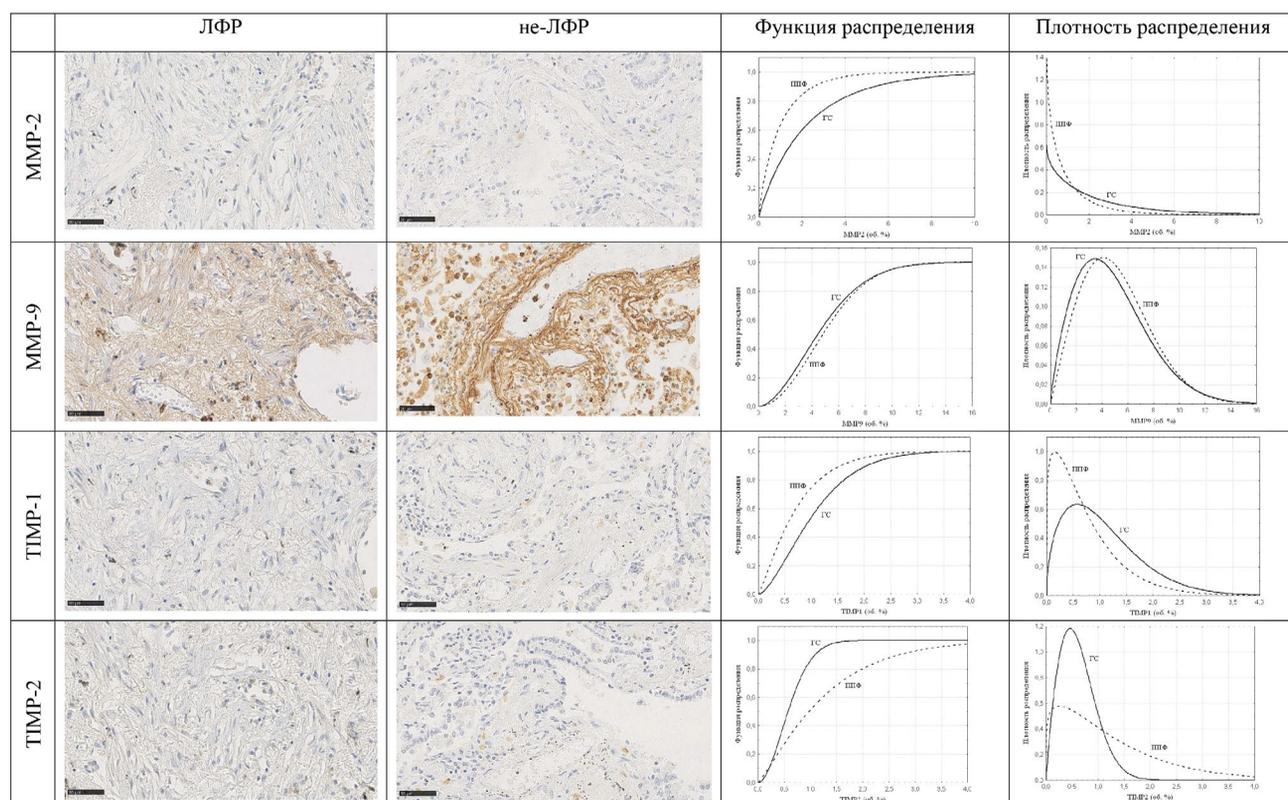


Рис. 3. Экспрессия матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов при ЛФР и не-ЛФР. Иммуногистохимический метод с антителами против MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, полимерная тест-система. Увеличение $\times 400$. Маркер 50 μm . ЛФР и ППФ — радиационный легочный фиброз, не-ЛФР — нерадикационный легочный фиброз, ГС — группа сравнения (не-ЛФР).

Fig. 3. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in LF and non-LF specimens. Immunohistochemistry with antibodies against MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, the polymer test-system. Magnification $\times 400$. Scale 50 μm . LF and ППФ denote plutonium-induced LF, non-LF denote lung fibrosis of a different origin, ГС denotes controls (no pulmonary pathology).

Таблица 4. Параметрические характеристики распределений при аппроксимации моделью Вейбулла показателей в 1-й и 2-й группах
Table 4. Parameter characteristics of distributions in the approximation of indicators estimated for groups 1 and 2 using the Weibull's model

Показатель	Характеристики W-model						Значимость различий			
	Группа 1 (n = 56)			Группа 2 (n = 34)			Модуль Me	Уровень значимости P	Модуль V	Уровень значимости P
	Me ± Δ	V ± ΔV	R ²	Me ± ΔMe	V ± ΔV	R ²				
Общий объем коллагеновых волокон	12.331 ± 0.050	2.172 ± 0.030	0.997	10.872 ± 0.068	3.153 ± 0.0114	0.989	1.459	<10 ⁻⁴	0.981	<10 ⁻⁴
Ретикулиновые волокна	8.004 ± 0.042	2.156 ± 0.040	0.994	6.213 ± 0.224	1.259 ± 0.086	0.954	1.791	<10 ⁻⁴	0.897	<10 ⁻⁴
Эластические волокна	7.640 ± 0.057	2.353 ± 0.065	0.986	6.892 ± 0.062	3.084 ± 0.154	0.980	0.748	<10 ⁻⁴	0.731	<10 ⁻⁴
Эпителиальные структуры	3.587 ± 0.042	1.493 ± 0.039	0.986	3.658 ± 0.025	2.271 ± 0.056	0.993	0.071	0.291	0.778	<10 ⁻⁴
Collagen type I	7.113 ± 0.031	2.297 ± 0.034	0.996	7.967 ± 0.057	2.259 ± 0.054	0.993	0.854	<10 ⁻⁴	0.038	0.532
Collagen type IV	1.860 ± 0.017	1.458 ± 0.030	0.992	1.695 ± 0.013	1.916 ± 0.044	0.994	0.165	<10 ⁻⁴	0.458	<10 ⁻⁴
Collagen type V	2.740 ± 0.023	1.750 ± 0.038	0.990	1.573 ± 0.025	1.606 ± 0.062	0.982	1.167	<10 ⁻⁴	0.144	0.038
ММР-2	0.650 ± 0.014	0.878 ± 0.024	0.983	1.477 ± 0.035	0.928 ± 0.030	0.987	0.827	<10 ⁻⁴	0,050	0,200
ММР-9	4.80 ± 0.040	2.018 ± 0.053	0.987	4.424 ± 0.060	1.804 ± 0.070	0.984	0.377	<10 ⁻⁴	0.214	0,016
ТМР-1	0.559 ± 0.006	1.175 ± 0.025	0.991	0.926 ± 0.016	1.511 ± 0.066	0.982	0.367	<10 ⁻⁴	0.335	<10 ⁻⁴
ТМР-2	0.967 ± 0.011	1.169 ± 0.022	0.992	0.571 ± 0.006	1.865 ± 0.063	0.989	0.396	<10 ⁻⁴	0.696	<10 ⁻⁴
ИРБ	1.254 ± 0.003	4.057 ± 0.059	0.996	1.457 ± 0.011	3.732 ± 0.174	0.978	0.203	<10 ⁻⁴	0.325	0.039

Примечание. Статистически значимое различие параметров распределений (Me и V) в 1-й и во 2-й группах оценивалось с помощью двухстороннего t-критерия Стьюдента.

Дополнительные расчеты с помощью моделей нелинейного регрессионного анализа не дали положительных результатов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее неоднократно было показано, что условия труда в первые годы работы ПО “Маяк” (1948–1958 гг.) были крайне неблагоприятными [28]. Невозможность обеспечения полной герметизации технологического оборудования, частые ремонты, монтажно-демонтажные работы, низкий уровень автоматизации привели к высоким уровням α -активных аэрозолей в воздухе производственных помещений. Поскольку средства индивидуальной защиты органов дыхания на ПО “Маяк” не использовались до 1960-х годов, значительное количество α -активных частиц попадали в организм работников, преимущественно ингаляционным путем, накапливаясь в органах основного депонирования (легкие, печень и скелет) [3, 29].

Большое количество α -треков и их агрегатов («солнечных вспышек») в рубцах соединительной ткани при автордиографии регистрировали у работников с ЛФР, а единичные α -треки в периваскулярной и перибронхиальной тканях и во внутрилегочных лимфатических узлах — у работников с пневмофиброзом другого генеза (не-ЛФР) [30].

Исследования распределения плутония в организме работников ПО “Маяк”, основанные на анализе биологических образцов тканей легких, показали, что большая часть α -активности депонируется в легких и трахеобронхиальных лимфатических узлах [3, 30, 31].

В литературе описаны случаи и патогенез пневмонита и легочного фиброза после лучевой терапии [4, 29, 32–34]. Патогенез легочного фиброза вследствие воздействия альфа-излучения также всесторонне изучался в экспериментах на животных [15, 35, 36]. Изменения, произошедшие на ранней стадии развития ЛФР, включали инфильтрацию очагов фиброза мононуклеарными клетками, окружающими альвеолы, альвеолярные протоки и бронхиолы; повышение уровня клеток альвеолярного эпителия типа II и накопление экссудата. В дальнейшем наблюдались скопления гистиоцитов, поглощающих экссудативный выпот. Имелось значительное утолщение альвеолярных перегородок за счет отека; образование соединительной ткани; и накопление тучных, плазматических и альвеолярных клеток. Разрастание соединительной ткани вокруг альвеол представляет собой морфоло-

гическую основу ЛФР [4, 29, 37]. Показано, что общий объем соединительной ткани в образцах легких при ЛФР увеличен на 40% по сравнению с тканями легких без очагов легочного фиброза [38]. По мнению исследователей, макрофаги по-прежнему остаются основными клетками-мишенями в легочной ткани при воздействии α -излучения от инкорпорированного плутония, независимо от физико-химических свойств соединений плутония и, вероятно, играют ведущую роль в развитии раннего повреждения легочной ткани [37].

Динамическое наблюдение за работниками ПО “Маяк” позволило выявить профессиональные заболевания (в том числе реакции легочной ткани) на ранних стадиях их развития [8, 9, 1, 2].

Отложение белков ВКМ, таких как коллагены, со структурными искажениями, утолщением альвеолярных стенок и перибронхиолярным и субплевральным фиброзом являются отличительными признаками легочного фиброза. Во время процесса рубцевания баланс между синтезом и деградацией ВКМ смещается в сторону повышенного синтеза, опосредованного факторами роста, включая TGF- β 1. Помимо увеличения продукции коллагена фибробластами, TGF- β 1 может также способствовать отложению коллагена в легких за счет подавления секреции MMP или стимуляции секреции ее ингибиторов, за счет усиления пролиферации и миграции фибробластов, за счет секреции факторов роста (например, тромбоцитарный фактор роста), или путем индукции эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [39].

В настоящем исследовании использованы биологические образцы тканей легких (взятые при аутопсии) работников ПО “Маяк”, которым был поставлен клинический диагноз ЛФР прижизненно, и сравнивали их с образцами тканей легких работников с диагнозом “не-ЛФР” (по результатам аутопсии). Выявлено снижение плотности ретикулярной стромы (коллаген III типа) в обеих исследуемых группах с фиброзом. В то же время очаги ЛФР и не-ЛФР демонстрировали повышенное содержание эластических волокон; при этом их структура была изменена. Никаких отличительных особенностей ни в структуре, ни в составе ретикулярных и эластических волокон не наблюдалось ни в одной из исследуемых групп. Таким образом, сравнительный анализ показал, что изменения соединительнотканного каркаса легких, индуцированные ЛФР, не отличаются от соответствующих изменений, обусловленных легочным фиброзом другой этиологии.

Однако статистический анализ выявил качественные и количественные отличительные морфологические особенности ЛФР по сравнению с не-ЛФР. Результаты статистического анализа подтвердили вывод о том, что ЛФР представляет собой особый тип легочного фиброза с гиперпродукцией коллагена типов IV и V, которые играют ключевую роль в развитии фиброза. В отличие от легочного фиброза, вызванного внутренним α -излучением от инкорпорированных радионуклидов, легочный фиброз, развившийся в результате исхода хронических заболеваний легких, характеризуется сходными уровнями коллагенов типов в I, IV и V фиброзных очагах.

TGF- β 1 играет важную роль в развитии легочного фиброза. Повышенная экспрессия TGF- β 1 приводит к рекрутированию моноцитов и макрофагов в очаг воспаления, усиливает созревание и активацию фибробластов и стимулирует ЭМП. Сообщалось, что хроническое радиационно-индуцированное поражение легких увеличивает экспрессию и активацию TGF- β 1, что приводит к истощению паренхиматозных клеток и избыточному фиброзу [40]. ЭМП играет важную роль в опосредованном TGF фиброгенезе [41]. Результаты этого исследования позволяют предположить, что хроническое воздействие α -активных нуклидов на легочную ткань индуцирует опосредованную TGF- β 1 выработку коллагена типа V при формировании очагов ЛФР. Между тем не-ЛФР, в основном вызванный хроническим воспалением, не демонстрирует повышенных уровней какого-либо определенного типа коллагена в пораженных фиброзом тканях.

Коллаген V типа имеет второстепенное значение, дополняя коллаген типа I, который является основным коллагеном тканей легких. В здоровых легких коллаген типа V расположен в периваскулярной и перибронхиальной соединительной ткани [42, 43]. Коллаген типа V продуцируется в различных мезенхимальных клетках, и экспрессия его генов опосредована TGF. Сообщалось, что коллаген типа V участвует в развитии легочного фиброза вследствие аутоиммунных заболеваний, опосредованных Т-хелперами (Th17), системного склероза [44, 45]. Нарушение регуляции коллагена V типа во время ремоделирования внеклеточного матрикса может объяснить измененную архитектуру фибриллярных коллагенов в интерстиции легких, выступающих в качестве критического промотора легочного фиброза. Активация коллагена типа V наблюдалась при карциномах кожи, раке молочной железы и колоректальном раке [46].

Коллаген типа I является основным фибриллярным компонентом ряда тканей. Скорость резорбции и продукция коллагена типа I увеличиваются примерно в равной степени у пациентов с диагнозом рака легкого, а стимулированный опухолевыми клетками лизис коллагена типа I сопровождается усиленной выработкой того же типа коллагена в тканях легких [47]. Коллаген типа I образует толстые коллагеновые волокна, что было выявлено гистологически, и составляет основную часть коллагена в организме. Этот тип составляет большую часть органической матрицы оснований, но также является основным структурным белком в легких.

Коллаген типа IV был охарактеризован в структурах, идентифицированных морфологически как базальные мембраны. Общеизвестно, что коллаген типа IV не образует волокон или фибрилл, видимых при световом микроскопическом исследовании. Кроме того, сообщалось о роли коллагена типа IV в развитии рака легкого [48].

Изменения ВКМ наблюдались в исследованиях легочного фиброза, индуцированного ХОБЛ, идиопатического легочного фиброза и экспериментальных моделей фиброза, индуцированного блеомицином. Во всех исследованиях было выявлено ремоделирование легочной паренхимы с изменением соотношения коллагенов типов I / III [49–55].

В настоящем исследовании мы наблюдали повышенное содержание коллагена V типа в очагах ЛФР по сравнению с не-ЛФР. В целом наблюдаемые структурные изменения паренхимы легкого в группе не-ЛФР согласуются с результатами других исследований.

Матриксные металлопротеиназы MMP-2 и MMP-9 по своему биологическому действию являются желатиназами и имеют точкой приложения своего воздействия коллаген типа IV и денатурированный коллаген [56]. В литературе отводится большая роль воздействию MMP в развитии пневмосклероза различного генеза, в том числе при системных заболеваниях соединительной ткани, наследственных синдромах, экспериментальном пневмофиброзе и др. [57, 58]. Протеолитическая активность MMP в основном связана с деградацией компонентов ВКМ. Новые данные показывают, что, помимо ремоделирования ВКМ, MMP играют ключевую роль в воспалении, клеточной пролиферации и повреждении сосудов. Следовательно, избыток MMP может способствовать воспалительной реакции и приводить к активации фибробластов, что приводит к ускорению развития фиброза [59].

Активность ММР обычно ингибируется эндогенными тканевыми ингибиторами металлопротеиназ, которые также играют важную роль в поддержании мезенхимального гомеостаза. При этом, опубликованные данные о функциональной роли TIMP-1 в фиброгенезе неоднозначны, хотя преобладают данные, подтверждающие профибротическую функцию TIMP-1 [60]. Кроме того, TIMP-1 оказывает антиапоптотическое действие в лимфоцитах и эпителиальных клетках, а сверхэкспрессия TIMP-1 в клетках рака молочной железы способствует VEGF-опосредованному ангиогенезу [61, 62]. Как антиапоптотический, так и проангиогенный эффекты часто рассматриваются как механизмы развития опухоли.

Полученные в настоящем исследовании результаты хорошо согласуются с результатами предыдущих исследований, показывающими повышенные уровни ММР в легочной ткани при предопухоловой и опухолевой патологии легких у лиц, длительное время подвергавшихся радиационному воздействию [56].

Мы признаем, что результаты этого исследования следует интерпретировать с осторожностью в связи с его небольшой статистической мощностью. Мы планируем продолжить исследования ВКМ и ЭМП в этих уникальных биологических образцах, собранных у работников, подвергшихся внутреннему альфа-облучению в высоких дозах.

До сих пор существует ряд вопросов, например, могут ли специфические повреждения легочной ткани вследствие внутреннего α -облучения способствовать повышению риска развития рака легкого, о котором сообщалось ранее в эпидемиологических исследованиях когорты работников ПО “Маяк” [14, 16, 63]. Следует отметить, что к концу периода наблюдения (31.12.2018 г.) рак легкого был зарегистрирован у 36.2% работников с ЛФР [5].

Лучшее понимание молекулярных механизмов развития легочного фиброза при профессиональном хроническом облучении может помочь в поиске новых биологических маркеров и идентификации биологических мишеней для широкого круга заболеваний, связанных с легочным фиброзом различной этиологии [64].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патогенез фиброза представляет собой многоэтапный процесс, инициируемый повреждением органа и приводящий к интегральной реакции с участием воспалительных клеток, активации каскада

цитокинов, факторов роста и в конечном итоге — к ремоделированию внеклеточного матрикса.

В результате проведенного исследования обнаружены качественные и количественные морфологические особенности ЛФР при сравнении с ЛФР другого генеза, позволяющие заключить, что ЛФР — это особый тип пневмофиброза, при котором отмечены особенности локализации и архитектоники очагов фиброза легочной ткани, нарушения содержания коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон легочной стромы. Анализ показал, что гиперпродукция коллагена типа V играет ключевую роль в развитии ЛФР. Кроме этого, в развитии пневмофиброза важную роль играет нарушение баланса между экспрессией ММР и их ингибиторов. Высокий уровень ММР в очагах пневмофиброза у лиц, подвергшихся профессиональному хроническому внутреннему α -облучению, может способствовать разрушению белков экстрацеллюлярного матрикса и базальных мембран и ремоделированию соединительной ткани легких. В результате деградации матрикса под действием ММР образуются биологически активные соединения, оказывающие влияние на дифференцировку и пролиферацию клеток. Таким образом, нельзя исключить влияние дисбаланса в системе ММР на развитие неопластических процессов в легочной ткани. Возможно, нарушение регуляции экспрессии коллагена V типа при ремоделировании внеклеточного матрикса может объяснить нарушенную архитектуру фибриллярных коллагенов легочного интерстиция и является критическим фактором, способствующим развитию легочного фиброза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России в рамках контракта от 11 июня 2021 г. № 27.501.21.2 “Модернизация высокотехнологичных методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО “Маяк” и население Уральского региона” (шифр: “Медицинские последствия-21”).

The work was financially supported by the Federal Medical and Biological Agency under contract No. 27.501.21.2 dated June 11, 2021 “Modernization of high-tech methods aimed at identifying the medical consequences of radiation exposure on the personnel of the Mayak Production Association and the population of the Ural region” (code “Medicinskie posledstviya-21”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуськова А.К., Байсоголов Г.Д. Лучевая болезнь человека. М.: Медицина, 1971; 382 с. [Guskova A.K., Baisogolov G.D. Luchevaya bolizn cheloveka = Human Radiation Syndrome (Sketches). Moscow: Medicine, 1971. 382 p. (In Russ.)].
2. Guskova A., Baisogolov G.D. Radiation Sickness in Man (Outlines). New York: United Nations, 1971.
3. Плутоний. Радиационная безопасность. Под ред. Л.А. Ильина. М.: ИздАТ, 2005. 416 с. [Plutoniya. Radiatsionnaya bezopasnost = Plutonium. Radiation safety. Edited by Ilyin L.A. Moscow: IzdAT, 2005. 416 p. (In Russ.)].
4. Authors on behalf of ICRP; Stewart F.A., Akleyev A.V., Hauer-Jensen M., Hendry J.H., Kleiman N.J., Macvittie T.J., Aleman B.M., Edgar A.B., Mabuchi K., Muirhead C.R., Shore R.E., Wallace W.H. ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs—hreshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Ann ICRP*. 2012;41(1-2):1–322. <https://doi.org/10.1016/j.icrp.2012.02.001>
5. Azizova T., Moseeva M., Grigoryeva E. et al. Registry of Plutonium-induced Lung Fibrosis in a Russian Nuclear Worker Cohort. *Health Phys*. 2020;118(2):185–192. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001131>
6. Волкова Л.Г. Пневмосклероз как исход лучевой болезни, вызванной длительной интоксикацией плутонием. *Бюлл. радиац. медицины*. 1961;2:82–91. [Volkova L.G. Pnevmoskleroz kak iskhod luchevoy bolezni, vyzvannoy dlitel'noy intoksikatsiyey plutoniyem. *Bulletin of Radiation Medicine*. 1961;2:82–91 (in Russ.)].
7. Azizova T.V., Day R.D., Wald N. et al. N.G., Stetsenko L.A., Grigoryeva E.S., Krupenina L.N., Vlasenko E.V. The “clinic” medical-dosimetric database of Mayak production association workers: structure, characteristics and prospects of utilization. *Health Phys*. 2008;94(5):449–58. <https://doi.org/10.1097/01.HP.0000300757.00912.a2>
8. Azizova T.V., Zhuntova G.V., Haylock R. et al. Chronic bronchitis incidence in the extended cohort of Mayak workers first employed during 1948–1982. *Occup. Environ. Med*. 2017;74(2):105–113. <https://doi.org/10.1136/oemed-2015-103283>
9. Azizova T., Briks K., Bannikova M., Grigoryeva E. Hypertension Incidence Risk in a Cohort of Russian Workers Exposed to Radiation at the Mayak Production Association Over Prolonged Periods. *Hypertension*. 2019;73(6):1174–1184. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11719>
10. Azizova T.V., Grigoryeva E.S., Haylock R.G. et al. Ischaemic heart disease incidence and mortality in an extended cohort of Mayak workers first employed in 1948–1982. *Br. J. Radiol*. 2015;88(1054):20150169. <https://doi.org/10.1259/bjr.20150169>
11. Azizova T.V., Bannikova M.V., Grigoryeva E.S., Rybkina V.L. Risk of malignant skin neoplasms in a cohort of workers occupationally exposed to ionizing radiation at low dose rates. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205060>
12. Loffredo C., Goerlitz D., Sokolova S. et al. The Russian Human Radiobiological Tissue Repository: A Unique Resource for Studies of Plutonium-Exposed Workers. *Radiat. Prot. Dosim*. 2017;173(1-3):10–15. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncw303>
13. Sokolnikov M.E., Gilbert E.S., Preston D.L. et al. Lung, liver and bone cancer mortality in Mayak workers. *Int. J. Cancer*. 2008;123(4):905–11. <https://doi.org/10.1002/ijc.23581>
14. Gilbert E.S., Sokolnikov M.E., Preston D.L. et al. Lung cancer risks from plutonium: an updated analysis of data from the Mayak worker cohort. *Radiat. Res*. 2013;179(3):332–42. <https://doi.org/10.1667/RR3054.1>
15. Koshurnikova N.A., Aristov V.P., Lemberg V.K. et al. Mechanism of development of plutonium-induced pulmonary sclerosis. *Health Phys*. 1972;22(6):753–4. <https://doi.org/10.1097/00004032-197206000-00033>
16. Tokarskaya Z.B., Okladnikova N.D., Belyaeva Z.D., Drozhko E.G. The influence of radiation and non-radiation factors on the lung cancer incidence among the workers of the nuclear enterprise Mayak. *Health Phys*. 1995;69(3):356–66. <https://doi.org/10.1097/00004032-199509000-00007>
17. Ashcroft T., Simpson J.M., Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol*. 1988;41(4):467–70. <https://doi.org/10.1136/jcp.41.4.467>
18. Hübner R.H., Gitter W., El Mokhtari N.E. et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques*. 2008;44(4):507–11, 514–7. <https://doi.org/10.2144/000112729>
19. Есипова И.К. Патологическая анатомия легких. М.: Медицина, 1976. 183 с. [Esipova I.K. Patologicheskaya anatomiya legkih = Pathological anatomy of the lungs. Moscow: Medicine, 1976. 183 p. (in Russ.)].
20. Allen D.C., Cameron R.I., ed. Histopathology specimens. Clinical, pathological and laboratory aspects. 2nd ed. Berlin (Germany): Springer, 2013. 512 p.
21. Suvarna K., Layton C., Bancroft J.D. Bancroft’s theory and practice of histological techniques. 8th ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier, 2018. 672 p.
22. Sychugov G., Azizova T., Osovets S. et al. Morphological features of pulmonary fibrosis in workers occupationally exposed to alpha radiation. *Int. J. Radiat. Biol*. 2020;96(4):448–460. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1721601>
23. Rydell-Törmänen K., Andréasson K., Hesselstrand R. et al. Extracellular matrix alterations and acute inflammation; developing in parallel during early induction of pulmonary fibrosis. *Lab. Invest*. 2012;92(6):917–25. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.57>
24. Gilhodes J.C., Julé Y., Kreuz S. et al. Quantification of Pulmonary Fibrosis in a Bleomycin Mouse Model Using Automated Histological Image Analysis. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170561>
25. Lawson C.L., Hanson R.J. Solving Least Squares Problems. Revised republication. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics, 1996. 352 p.
26. Draper N.R., Smith H. Applied Regression Analysis, 3rd edition. New York: John Wiley&Sons, 1998. 736 p.
27. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика: монография. М.: Физматлит, 2012. 816 с. [Kobzar A.I. Prikladnaya matematicheskaya statistika = Applied Mathematical Statistics. Moscow: Fizmatlit, 2012. 816 p. (in Russ.)].

28. Kruglov A. The History of the Soviet Atomic Industry. London: Taylor and Francis, 2002. 288 p.
29. Дощенко Н.В., Кисловкая И.Л., Лемберг В.К., Нифатов А.П. Клинико-морфологическая характеристика плутониевого пневмосклероза различных стадий. *Бюлл. радиац. медицины*. 1967;3:32–46. [Doshchenko N.V., Kislovkaya I.L., Lemberg V.K., Nifatov A.P. Kliniko-morfologicheskaya kharakteristika plutoniyevoogo pnevmosklerozaz razlichnykh stadiy. *Bulletin of Radiation Medicine*. 1967;3:32–46 (in Russ.)].
30. Hahn F.F., Romanov S.A., Guilmette R.A., Nifatov A.P., Zaytseva Y.V., Diel J.H., Allen S.W., Lyovkina Y.V. Distribution of plutonium particles in the lungs of Mayak workers. *Radiat. Prot. Dosimy*. 2003;105(1-4):81–4. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006326>
31. Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 2. Ingestion dose coefficients. A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection. *Ann. ICRP*. 1993;23(3-4):1–167.
32. Coggle J.E., Lambert B.E., Moores S.R. Radiation effects in the lung. *Environ Health Perspect*. 1986;70:261–91. <https://doi.org/10.1289/ehp.8670261>
33. McDonald S., Rubin P., Phillips T.L., Marks L.B. Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 1995;31(5):1187–203. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(94\)00429-0](https://doi.org/10.1016/0360-3016(94)00429-0)
34. Bentzen S.M., Skoczylas J.Z., Bernier J. Quantitative clinical radiobiology of early and late lung reactions. *Int. J. Radiat. Biol*. 2000;76(4):453–62. <https://doi.org/10.1080/095530000138448>
35. Brooks A.L., Guilmette R.A., Hahn F.F. et al. Distribution and biological effects of inhaled $^{239}\text{Pu}(\text{NO}_3)_4$ in cynomolgus monkeys. *Radiat. Res*. 1992;130(1):79–87.
36. Park J.F., Watson C.R., Buschbom R.L. et al. Biological effects of inhaled $^{239}\text{PuO}_2$ in Beagles. *Radiat. Res*. 2012;178(5):447–67. <https://doi.org/10.1667/RR2504.1>
37. Van der Meer A., Gremy O., Renault D. et al. Plutonium behavior after pulmonary administration according to solubility properties, and consequences on alveolar macrophage activation. *J. Radiat. Res*. 2012;53(2):184–94. <https://doi.org/10.1269/jrr.11112>
38. Сычугов Г.В., Казачков Е.Л., Азизова Т.В. и др. Иммуноморфологические особенности пневмофиброза у работников плутониевого производства. *Уральский мед. журн*. 2014;8(122):71–76. [Sychugov G.V., Kazachkov E.L., Azizova T.V. et al. Immunomorphological characteristics of pneumofibrosis at workers of plutonium manufacture. *Ural. Med. J. Pathomorphology*. 2014;8(122):71–76 (In Russ.)].
39. Urawa M., Kobayashi T., D'Alessandro-Gabazza C.N. et al. Protein S is protective in pulmonary fibrosis. *J. Thromb. Haemost*. 2016;14(8):1588–99. <https://doi.org/10.1111/jth.13362>
40. Almeida C., Nagarajan D., Tian J. et al. The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury. *PLoS One*. 2013;8(1):e53628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053628>
41. Tabata C., Kadokawa Y., Tabata R. et al. All-trans-retinoic acid prevents radiation- or bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2006;174(12):1352–60. <https://doi.org/10.1164/rccm.200606-862OC>
42. Madri J.A., Furthmayr H. Collagen polymorphism in the lung. An immunohistochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum. Pathol*. 1980;11(4):353–66. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(80\)80031-1](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(80)80031-1)
43. Yoshida S., Haque A., Mizobuchi T. et al. Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce rejection pathology in fresh and well-healed lung transplants. *Am. J. Transplant*. 2006;6(4):724–35. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01236.x>
44. Parra E.R., Aguiar A.C. Jr, Teodoro W.R. et al. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin. Respir. J*. 2009;3(3):135–42. <https://doi.org/10.1111/j.1752-699X.2008.00118.x>
45. Sullivan J.A., Jankowska-Gan E., Hegde S. et al. Th17 Responses to Collagen Type V, $\alpha 1$ -Tubulin, and Vimentin Are Present Early in Human Development and Persist Throughout Life. *Am. J. Transplant*. 2017 Apr;17(4):944–956. <https://doi.org/10.1111/ajt.14097>
46. Mak K.M., Png C.Y., Lee D.J. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2016;299(5):613–29. <https://doi.org/10.1002/ar.23330>
47. Kobayashi T., Gabazza E.C., Taguchi O. et al. Type I collagen metabolites as tumor markers in patients with lung carcinoma. *Cancer*. 1999;85(9):1951–7.
48. Polette M., Thiblet J., Ploton D. et al. Distribution of $\alpha 1(\text{IV})$ and $\alpha 3(\text{IV})$ chains of type IV collagen in lung tumours. *J. Pathol*. 1997;182(2):185–91. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199706\)182:2<185::AID-PATH828>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199706)182:2<185::AID-PATH828>3.0.CO;2-F)
49. Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J. et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(35):13180–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605669103>
50. Dunsmore S.E. Treatment of COPD: a matrix perspective. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis*. 2008;3(1):113–22. <https://doi.org/10.2147/copd.s1119>
51. Suki B., Bates J.H. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. *Respir. Physiol. Neurobiol*. 2008;163(1-3):33–43. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.03.015>
52. Burgstaller G., Oehrle B., Gerckens M. et al. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *Eur. Respir. J*. 2017;50(1):1601805. <https://doi.org/10.1183/13993003.01805-2016>
53. Désogère P., Tapias L.F., Hariri L.P. et al. Type I collagen-targeted PET probe for pulmonary fibrosis detection and staging in preclinical models. *Sci. Transl. Med*. 2017;9(384):eaaf4696. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf4696>
54. O'Dwyer D.N., Moore B.B. The role of periostin in lung fibrosis and airway remodeling. *Cell Mol. Life Sci*. 2017;74(23):4305–4314. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2649-z>
55. Jones M.G., Andriotis O.G., Roberts J.J. et al. Nanoscale dysregulation of collagen structure-function disrupts mechano-homeostasis and mediates pulmonary fibrosis. *Elife*. 2018;7:e36354. <https://doi.org/10.7554/eLife.36354>

56. Сагиндикова Г.Е., Коган Е.А., Сатбаева Э.Б., Парамонова Н.Б. Матриксные металлопротеиназы, их ингибиторы и ангиогенез при различных морфологических вариантах предрака легкого у жителей радиоактивно-загрязненных территорий семипалатинской области Казахстана. *Арх. патол. науки.* 2008;70(2):21–25. [Sagindikova G.E., Kogan E.A., Satbayeva E.B., Paramonova N.B. Matrix metalloproteinases, their inhibitors and angiogenesis in different morphological types of lung precancer in persons who have long lived in the radioactive substance-polluted area of the Semipalatinsk Region, Kazakhstan. *Ark. Patol.* 2008;70(2):21–5 (In Russ.)].
57. Vafashoar F., Mousavizadeh K., Poormoghim H. et al. Gelatinases Increase in Bleomycin-induced Systemic Sclerosis Mouse Model. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* 2019;18(2):182–189.
58. Summer R., Krishna R., Schriener D. et al. Matrix metalloproteinase activity in the lung is increased in Hermansky-Pudlak syndrome. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2019;14(1):162.
<https://doi.org/10.1186/s13023-019-1143-0>
59. Adamidis K.N., Kopaka M.E., Petraki C. et al. Iomerular expression of matrix metalloproteinases in systemic lupus erythematosus in association with activity index and renal function. *Ren. Fail.* 2019;41(1):229–237.
<https://doi.org/10.1080/0886022X.2019.1591998>
60. Thiele N.D., Wirth J.W., Steins D. et al. TIMP-1 is upregulated, but not essential in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis in mice. *Sci. Rep.* 2017;7(1):714.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00671-1>.
61. Song T., Dou C., Jia Y. et al. TIMP-1 activated carcinoma-associated fibroblasts inhibit tumor apoptosis by activating SDF1/CXCR4 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(14):12061–79.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3616>
62. Yoshiji H., Harris S.R., Raso E. et al. Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int. J. Cancer.* 1998;75(1):81–7.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19980105\)75:1<81::aid-ijc13>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19980105)75:1<81::aid-ijc13>3.0.co;2-g)
63. Кошурникова Н.А., Сокольников М.Э., Фомин Е.П. Избыточный относительный риск заболеваемости раком легкого в зависимости от гистотипа опухоли. *Вопр. радиац. безопасности.* 2014;4(76):62–69. [Koshurnikova N.A., Sokolnikov M.E., Fomin E.P. Excess relative lung cancer risk depending on the histological type of the tumor. *J. Radiat. Saf. Issue.* 2014;4(76):62–69 (In Russ.)].
64. Flechsig P., Dadrich M., Bickelhaupt S. et al. LY2109761 attenuates radiation-induced pulmonary murine fibrosis via reversal of TGF- β and BMP-associated proinflammatory and proangiogenic signals. *Clin. Cancer Res.* 2012;18(13):3616–27.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2855>

Pathomorphological Features of Lung Fibrosis in Individuals Occupationally Exposed to Alpha Radiation

G. V. Sychugov¹, T. V. Azizova^{2,*}, S. V. Osovets², E. L. Kazachkov¹,
E. S. Grigoryeva², A. G. Sychugov¹

¹South Ural State Medical University affiliated, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

²Southern Urals Biophysics Institute affiliate, Federal Medical Biological Agency, Ozyorsk, Russia

*E-mail: clinic@subi.su

The aim of this study was to search for the specific morphological features of radiation-induced lung fibrosis compared to pulmonary fibrosis of another origin, using biological specimens of lung tissue collected from workers internally exposed to alpha radiation. The morphological features of lung fibrosis were defined using biological specimens of lung tissue that had been collected during autopsy examinations from 56 workers diagnosed with plutonium-induced lung fibrosis during life, from 34 workers with lung fibrosis of another origin (due to chronic inflammatory lung diseases) and from 35 workers without clinical pulmonary pathology (controls). The total lung-absorbed dose of gamma radiation from external exposure did not significantly differ among the studied groups, and the total lung-absorbed dose of alpha radiation from internal exposure was significantly higher in workers with plutonium-induced lung fibrosis. To investigate the extracellular matrix components, mono- and polyclonal labeled antibodies against type I, IV, and V collagens were used. In addition, to evaluate the system of extracellular matrix metabolism regulation, the antibodies against matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 were used. The study revealed qualitative and quantitative morphological peculiarities of plutonium-induced lung fibrosis compared to lung fibrosis of another origin. This allows us to conclude that plutonium-induced lung fibrosis is a specific type of lung fibrosis, which is characterized with specific location and architectonics of fibrosis foci within the lung, and with changes in levels of collagen, elastic and reticular fibers in the pulmonary stroma. The analysis demonstrated that hyperproduction of type V collagen plays a key role in the development of plutonium-induced lung fibrosis. In addition, the imbalance between the expression of MMPs and their inhibitors plays an important role in the development of lung fibrosis.

Keywords: occupational radiation exposure, alpha radiation, lung fibrosis, extracellular matrix, Mayak PA

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Сычугов Глеб Вячеславович (Sychugov Gleb V.) —
e-mail: docsgv@yandex.ru;
<https://orcid.org/0000-0003-3251-6944>

Азизова Тамара Васильевна (Azizova Tamara V.) —
e-mail: clinic@subi.su;
<https://orcid.org/0000-0001-6954-2674>

Осовец Сергей Васильевич (Osovets Gergey V.) —
e-mail: osovets1@yandex.ru;
<https://orcid.org/0000-0002-6180-2061>

Казачков Евгений Леонидович (Kazachkov Evgeniy L.) —
e-mail: doctorkel@yandex.ru;
<https://orcid.org/0000-0002-4512-3421>

Григорьева Евгения Сергеевна (Grigoryeva Evgeniya S.) —
e-mail: grig@subi.su;
<https://orcid.org/0000-0003-1806-9922>

Сычугов Александр Глебович (Sychugov Aleksander G.) —
e-mail: docsgv@yandex.ru;
<https://orcid.org/0009-0004-4803-1022>

Вклад авторов. Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

The authors declare no conflicts of interests.