

**АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ В ПРОЦЕССЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ
ЛЕГКИХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРЕРЫВИСТОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
ДИОКСИДА АЗОТА**

М.Я. Козлова, Е.С. Лебедева, Т.Н. Преображенская, А.Н. Гребенюк

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова,

Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6.

Тел. +7 (812) 542-20-91. E-mail: ele3260@yandex.ru

Резюме. В опытах на крысах Вистар оценивали интенсивность пероксидации липидов (ПОЛ), состояние антиоксидантной защиты легких и морфологическую перестройку легочной ткани в процессе длительного (15, 30 и 60 дней) прерывистого (1,5 часа в день) воздействия диоксида азота в концентрации, не оказывающей острого токсического эффекта на легочные структуры (30-40 мг/м³). С удлинением экспозиции диоксидом азота интенсивность ПОЛ нарастала: к 60 дню содержание малонового диальдегида в легочной ткани на 142 % превышало контрольный уровень (интактные крысы). В среднем в два раза снижались запасы восстановленного глутатиона и аскорбиновой кислоты, падала активность глутатионзависимых ферментов. Следствием деструктивных процессов, инициированных избыточным образованием свободных радикалов, стало формирование к 60 дню воздействия диоксида азота хронического воспалительного бронхолегочного процесса с признаками ремоделирования легочной ткани (эмфизема и очаговый фиброз). Высокая интенсивность ПОЛ, недостаточность антиоксидантной функции легких и структурные изменения легочной ткани сохранялись в течение полугода после прекращения ингаляционного воздействия диоксида азота.

Ключевые слова: пероксидация липидов, диоксид азота, хроническое воспаление, легкие.

ACTIVITY OF LIPID PEROXIDATION IN THE LUNG REMODELING INFLUENCED BY LONG-TIME INTERMITTENT EXPOSURE OF NITROGEN DIOXIDE

M.Y. Kozlova, E.S. Lebedeva, T.N. Preobrazhenskaya, A.N. Grebenjuk

Medical Military Academy

194044, Sankt-Petersburg, Lebedeva, 6

E-mail: ele3260@yandex.ru, tel.: +7 (812) 542-20-91

Summary. The intensity of lipid peroxidation (LPO), antioxidant status and morphological reconstruction of lung tissue were evaluated in Wistar rats during prolonged (15, 30 and 60 days) intermittent (1,5 h/day) exposure of nitrogen dioxide in concentration (30-40 mg/m³), which had no acute toxic effect on lung structures. With the elongation nitrogen dioxide exposure the intensity of LPO increased: at 60 day content of malondialdehyde in lung tissue was 142 % higher than in control (intact rats). Lung tissue reserves of reduced glutathione and ascorbic acid were twice declining. Activities of glutathione depending enzymes decreased. Consequence of destructive processes initiated by excessive production of free radicals was the formation chronic inflammatory bronchopulmonary process with signs of lung tissue remodeling (emphysema and focal fibrosis) at 60 day nitrogen dioxide exposure. The high intensity of LPO, insufficient antioxidant function and structural changes in lung tissue persisted for six months after cessation of nitrogen dioxide exposure.

Key words: lipid peroxidation, nitrogen dioxide, chronic inflammation, lung.

Важным фактором, влияющим на здоровье жителей крупных промышленных городов, является загрязнение атмосферного воздуха различными поллютантами и, как следствие, - регистрируемый во многих странах рост заболеваемости острыми и хроническими болезнями органов дыхания. Одним из наиболее агрессивных антропогенных поллютантов является диоксид азота, содержание которого в атмосфере мегаполисов может в десятки раз превышать гигиенические нормы [1]. Кроме того, реактивные азотные формы, включая диоксид азота и пероксинитрит, составляют значительную долю табачного дыма. При курении, особенно пассивном, человек подвергается воздействию диоксида азота в сверхвысоких концентрациях. Высокая

химическая реактивность и патогенность диоксида азота объясняются его свободнорадикальной природой и способностью проникать до терминальных отделов дыхательного тракта [2]. Результатом инициируемого диоксидом азота оксидативного стресса является прямой повреждающий эффект на легочные структуры (пероксидация липидов клеточных мембран, нитратирование тирозина), а также активация молекулярных механизмов, запускающих воспалительный процесс в легочной ткани (инактивация антипротеиназ, увеличенная секвестрация нейтрофилов в легочных капиллярах, экспрессия генов провоспалительных цитокинов и т.д.) [3, 4, 5, 6]. Однако пока неясно, что наносит больший вред – краткосрочное воздействие высоких концентраций оксидантных поллютантов, в частности диоксида азота, или периодическое воздействие низких концентраций в течение продолжительного времени [7].

Цель работы состояла в оценке интенсивности пероксидации липидов (ПОЛ), состояния антиоксидантной защиты легких и морфологической перестройки легочной ткани в процессе длительного прерывистого воздействия диоксида азота в концентрации, не оказывающей острого токсического эффекта на легочные структуры.

Материалы и методы исследования. Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г разводки питомника лабораторных животных РАМН (пос. Рапполово Всеволожского р-на Ленинградской обл.). Исследования проводились в соответствии с нормами, установленными приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 [8]. Животных помещали в специальную камеру, которая монтировалась в вытяжном шкафу и соединялась шлангом с лабораторной установкой для получения диоксида азота. Лабораторная установка состояла из колбы Вюрца с отводной трубкой и капельной воронки. Навеску нитрита натрия (50 мг) помещали в колбу Вюрца и с помощью капельной воронки по каплям прибавляли серную кислоту. В результате химической реакции: $2\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{NO} + \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ образовывалась смесь оксидов азота. Под влиянием кислорода воздуха, содержащегося в колбе, бесцветный оксид азота (NO) переходил в наиболее стабильный желто-бурый диоксид (NO_2), который по отводной трубке и соединительному шлангу нагнетался в экспериментальную камеру. Через специальное герметично закрывающееся отверстие в начале и в конце экспозиции из камеры забирались пробы воздуха для контроля концентрации диоксида азота, которая определялась колориметрическим методом и составляла 30-40 мг/м³ (15-19 ppm). Животные подвергались 30-минутным ингаляциям диоксида азота три раза в день с

интервалом между экспозициями 30 мин. При таких параметрах ингаляционного воздействия диоксида азота исключались острые токсические повреждения легких и образование метгемоглобина в количестве способном оказать влияние на развитие патологического процесса. Выполнены три серии экспериментов, при которых экспозиции диоксида азота повторялись в течение 15 дней (n=20), 30 (n=20) и 60 дней (n=30). В контроле животные (n=20) помещались в камеру, заполненную воздухом. После завершения 60-дневного периода ингаляции диоксида азота за 10 крысами продолжали наблюдение в течение полугода и обследовали через два и шесть месяцев. Эвтаназию животных осуществляли тиопенталом натрия в дозе 100 мг/кг.

Для гистологических исследований легкие расправляли введением через трахею 10% раствора формальдегида. Стандартно забранный материал заключали в парафин, срезы толщиной 5-7 мкм красили гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону. В ткани легкого определяли показатели перекисидации липидов (ПОЛ) и антиоксидантной системы. Для удаления крови легкие *in situ* перфузировали через легочную артерию охлажденным раствором 0,9 % хлорида натрия. Навеску ткани гомогенизировали. Для отделения ядер и крупных клеточных фрагментов гомогенат центрифугировали при 600 g в течение 10 мин, для осаждения лизосом и митохондрий повторно центрифугировали 20 мин при 16000 g. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты, гидроперекисей липидов (ГПЛ) – с помощью тиоцианата аммония. Содержание восстановленного глутатиона (Г-SH) и аскорбиновой кислоты, активности глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГП) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) определяли спектрофотометрическим методом. Активность ферментов рассчитывали на 1 мг белка в гомогенате. Количественные данные обрабатывали статистически с расчетом среднего значения и ошибки среднего; достоверность различий оценивали с помощью коэффициента Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Легкие представляют собой огромную по площади биологическую мембрану, постоянно контактирующую с кислородом воздуха и содержащимися в нем поллютантами. Ненасыщенность углеводородной цепи жирных кислот делает фосфолипиды клеточных мембран бронхоальвеолярного эпителия мишенью для вдыхаемого диоксида азота, обладающего сильным оксидативным потенциалом. Иницируемый диоксидом азота процесс перекисидации липидов ведет к образованию

липидных гидропероксидов (первичных продуктов ПОЛ) и может приобретать характер цепной реакции наработки свободных радикалов. После 15-дневной экспозиции диоксида азота намечалась тенденция к увеличению содержания в легочной ткани гидропероксидов липидов ($p > 0,05$), но только после 30 дней было отмечен достоверный прирост – в 1,4 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (табл. 1). Гидропероксиды липидов, являясь неустойчивыми соединениями, легко подвергаются дальнейшему превращению с образованием более устойчивых вторичных продуктов ПОЛ. Наиболее заметно по мере удлинения сроков воздействия диоксида азота росло содержание в легочной ткани малонового диальдегида (вторичного продукта ПОЛ) (табл. 1): после 15 дней – на 28 % ($p < 0,05$), после 30 – на 76 % ($p < 0,05$) и после 60 дней – на 142 % от контрольного уровня ($p < 0,05$). Усиление интенсивности ПОЛ происходило на фоне значительного уменьшения содержания в легочной ткани низкомолекулярных водорастворимых восстанавливающих агентов (табл. 2). Уменьшались запасы аскорбиновой кислоты, функциями которой являются защита мембранных липидов от окислительного повреждения и восстановление окисленной формы мембраносвязанного антиоксиданта α -токоферола [9]. После 15 дней ее содержание снижалось на 49 % ($p < 0,05$), после 30 дней – на 63 % ($p < 0,05$) и после 60 дней – на 58 % ($p < 0,05$). Столь же значительно снижался уровень важнейшего компонента антиоксидантной защиты – восстановленного глутатиона (табл. 2): после 15 дней воздействия диоксида азота – на 63 % ($p < 0,05$), после 30 дней – на 68 % ($p < 0,05$) и после 60 дней – на 56 % в сравнении с контролем ($p < 0,05$). Легкие (наряду с печенью) являются основным источником метаболизма глутатиона [10], и столь существенное снижение его запасов могло быть связано с недостаточной эффективностью ферментной глутатионзависимой системы (табл. 3). На протяжении первого месяца ингаляций диоксида азота активности ГП и Г6ФДГ (фермента пентозофосфатного пути, обеспечивающего поставку НАДФ-Н для поддержания уровня Г-SH в клетке) возрастали незначительно по сравнению с контролем: соответственно после 15 дней – на 13 % ($p < 0,05$) и 24 % ($p < 0,05$), после 30 дней – на 19 % ($p < 0,05$) и 30 % ($p < 0,05$). К 60 дню активность ГП снижалась на 21 % ($p < 0,05$), а Г6ФДГ – на 24 % от контрольных значений ($p < 0,05$). Недостаточность глутатионредуктазы проявлялась еще раньше: после 15-дневной экспозиции диоксида азота увеличения активности ГР не наблюдалось, а уже после 30-дневной экспозиции ее активность снижалась на 24 % по сравнению с контрольным значением ($p < 0,05$) и на 30 % после 60 дней ($p < 0,05$). Следствием снижения

активности ферментов антиоксидантной системы легких стало истощение клеточного пула восстановленного глутатиона и дальнейшая интенсификация ПОЛ.

Таблица 1.

Показатели пероксидации липидов в легочной ткани крыс в разные сроки после воздействия диоксида азота (NO₂) (M ± m)

Группы животных	Малоновый диальдегид, нмоль/г ткани	Гидропероксиды липидов, нмоль/мг ткани
15 дней NO ₂	48,1 ± 3,7 *	0,47 ± 0,05
30 дней NO ₂	66,0 ± 3,9 *	0,52 ± 0,06 *
60 дней NO ₂	91,2 ± 6,8 *	0,46 ± 0,07
2 мес после NO ₂	83,0 ± 5,9 *	0,64 ± 0,08 *
6 мес после NO ₂	53,3 ± 5,8 *	0,36 ± 0,02
Контроль	37,6 ± 3,4	0,37 ± 0,06

Примечание: * различие с контролем достоверно, p < 0,05.

Таблица 2.

Показатели неферментной антиоксидантной системы легких в разные сроки после воздействия диоксида азота (NO₂) (M ± m)

Группы животных	Глутатион-SH, мг%	Аскорбиновая кислота, мг%
15 дней NO ₂	21,7 ± 3,1 *	11,9 ± 1,3 *
30 дней NO ₂	18,5 ± 3,0 *	8,6 ± 0,8 *
60 дней NO ₂	25,7 ± 4,3 *	9,8 ± 1,4 *
2 мес после NO ₂	28,9 ± 2,9 *	13,5 ± 1,9 *
6 мес после NO ₂	30,5 ± 3,4 *	17,0 ± 1,2 *
Контроль	59,0 ± 6,5	23,2 ± 2,0

Примечание: * различие с контролем достоверно, p < 0,05.

Таблица 3.

Показатели ферментной антиоксидантной системы легких в разные сроки после воздействия диоксида азота (NO₂) (M ± m)

Группы животных	Глутатионпероксидаза, нмоль НАДФН/мин·мг	Глутатионредуктаза, мкг ГSH/мг	Глюкозо-6- фосфатдегидрогеназа,
-----------------	---	-----------------------------------	------------------------------------

			нмоль НАДФН/мин·мг
15 дней NO ₂	21,91±0,89 *	1,98±0,14	25,34±1,11 *
30 дней NO ₂	23,05±1,16 *	1,64±0,12 *	26,52±1,13 *
60 дней NO ₂	15,24±0,85 *	1,52±0,09 *	17,34±1,43 *
2 мес после NO ₂	21,31±1,52	2,35±0,16	24,56±2,15
6 мес после NO ₂	20,56±1,18	2,25±0,14	22,40±1,95
Контроль	19,37±0,59	2,16±0,15	22,71±1,24

Примечание: * различие с контролем достоверно, $p < 0,05$.

С удлинением продолжительности воздействия диоксида азота нарастали структурные изменения в легких: от острой реакции на повреждение до выраженной структурной перестройки легочной ткани. После 15 дней – отек подслизистого слоя бронхов, десквамация эпителия, участки перерастяжения легочной ткани, очаговая пролиферация бронхиального эпителия, гиперплазия лимфоидных образований в стенке бронхов, нарушение образования секрета бронхиальными железами. После 30 дней, наряду с описанными выше изменениями, выявлялись лимфоцитарно-лейкоцитарная инфильтрация подслизистого слоя и межальвеолярных перегородок, дистрофические изменения в эпителии бронхиальных желез, гиперплазия бокаловидных клеток и слущивание эпителия с обнажением базальных отделов. После 60 дней в эпителии бронхов выявлялись участки плоскоклеточной метаплазии и атрофии бронхиальных желез, умеренно выраженный перибронхиальный и периваскулярный склероз, а в респираторной части – признаки эмфиземы.

Морфологическая картина, сформировавшаяся в легких после 60 дней воздействия диоксида азота, по гистологическим критериям соответствовала проявлениям хронического воспаления [11]. Структурные изменения, развившиеся в бронхах и респираторных отделах легких в течение 60-дневной экспозиции диоксидом азота, сохранялись на протяжении шести месяцев наблюдения после прекращения воздействия диоксида азота, что позволяло говорить о хроническом воспалительном бронхолегочном процессе и ремоделировании легочной ткани. На фоне персистирующего воспаления интенсивность ПОЛ оставалась высокой и в постэкспозиционный период (табл. 1). Спустя два месяца после окончания ингаляций диоксида азота содержание липидных гидропероксидов превышало контрольное значение на 73 % ($p < 0,05$), МДА – на 121 % ($p < 0,05$). Содержание МДА и через полгода было существенно выше контрольного уровня – на 42 % ($p < 0,05$). В течение полугода не происходило восстановления легочного пула Г-

SH, содержание которого оставалось сниженным по сравнению с контролем в среднем на 50 % (табл. 2). Активность глутатионзависимых ферментов в восстановительный период несколько возрастала, достигая контрольных значений (табл. 3), но, по всей видимости, этого прироста было недостаточно для восполнения клеточных запасов Г-SH в легких. Учитывая множество функций, которые выполняет Г-SH в организме, истощение его внутриклеточных запасов существенно снижает устойчивость клеток к воздействию цитотоксических свободнорадикальных продуктов [9]. Содержание аскорбиновой кислоты после прекращения ингаляций диоксида азота также оставалось сниженным по сравнению с контролем (табл. 2): на 42 % ($p < 0,05$) и 27 % ($p < 0,05$) через два и шесть месяцев соответственно. Y. Zhang с соавт. [12] установили, что в низких концентрациях аскорбиновая кислота проявляет прооксидантные свойства и способствует продукции активных форм кислорода и усилению ПОЛ. Таким образом, даже в отсутствии внешнего повреждающего воздействия продолжается интенсивное образование свободных радикалов и усиленное расходование на их обезвреживание эндогенных антиоксидантов, что служит еще одним подтверждением хронического характера патологического процесса, сформировавшегося под влиянием длительного прерывистого воздействия ингаляционного оксиданта.

Результаты исследования показывают, что воздействие диоксида азота в режиме длительных прерывистых ингаляций, имитирующем режим эконогрузки, которой подвергается человек в бытовых и производственных условиях, не только инициирует, но и поддерживает цепной характер наработки радикальных форм в процессе ПОЛ. Истощение резервных возможностей антиоксидантной системы легких ведет к еще большему ускорению ПОЛ. В отсутствие воздействия внешнего прооксиданта источником эндогенного диоксида азота может стать персистирующее воспаление (через распад пероксинитрита или реакции, катализируемые пероксидазами) [1]. Окисление липидов цитоплазматических мембран ведет к конформационным изменениям в фосфолипидных комплексах, нарушению проницаемости, ионной селективности мембран и водно-ионного гомеостаза клетки и, как следствие, к утрате целостности органоидов и клеток. Морфологическим исходом являются описанные выше деструктивные изменения легочной ткани: слущивание эпителиоцитов с обнажением базальной мембраны, ведущее к утрате барьерной функции легочного эпителия и нарушению синтеза сурфактанта,

развитие эмфиземы вследствие освобождения протеолитических ферментов из разрушенных лизосом.

Выводы.

1. Длительное воздействие диоксида азота (30-40 мг/м³) в режиме прерывистых ингаляций сопровождается нарастающим усилением интенсивности пероксидации липидов в легочной ткани, снижением антиоксидантных резервов и угнетением активности глутатионзависимых ферментов. Избыточная продукция свободнорадикальных соединений приводит к выраженным деструктивным изменениям легочных структур, прежде всего бронхоальвеолярного эпителия.

2. Ежедневного полуторочасового воздействия диоксида азота в концентрации, не вызывающей острых токсических эффектов, достаточно для того, чтобы в течение двух месяцев у крыс сформировался хронический воспалительный бронхолегочный процесс с признаками ремоделирования легочной ткани (эмфизема и очаговый фиброз).

3. Высокий уровень интенсивности ПОЛ и дефицит антиоксидантной функции легких сохраняются на протяжении полугода после прекращения воздействия диоксида азота, что свидетельствует о значительных метаболических нарушениях в ткани легких и необходимости заместительной антиоксидантной терапии.

Литература

1. Persinger R.L., Poynter M.E., Ckless K., Janssen-Heininger Y.M. Molecular mechanisms of nitrogen dioxide induced epithelial injury in the lung // *Mol. Cell Biochem.* – 2002. – Vol. 234-235, № 1-2. – P. 71-80.
2. Nemery B. Respiratory diseases caused by acute inhalation of gases, vapours and dusts // *ERS handbook. Respiratory medicine* / Ed. P. Palange, A. Simonds. – 2010. – P. 273-277.
3. Barttesaghi S., Wenzel J., Trujillo M. et al. Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes // *Chem. Res. Toxicol.* – 2010. – Vol. 23, № 4. – P. 821-835.
4. Janssen-Heininger Y.M.W., Persinger R.L., Korn S.H. et al. Reactive nitrogen species and cell signaling. Implications for death or survival of lung epithelium // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2002. – Vol. 166, № 1. – P. S9-S16.

5. Macnee W., Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1999. – Vol. 160, № 5 (Pt. 2) – P. S58-S65.
6. Kovacic P., Somanathan R. Pulmonary toxicity and environmental contamination: radicals, electron transfer, and protection by antioxidants // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* – 2009. – Vol. 201, № 1. – P. 41-69.
7. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, NHLBI/WHO workshop report – National Heart Lung and Blood Institute, update 2010 / www.goldcopa.com.
8. Приказ Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации».
9. Коровина Н.А., Захарова И.Н., Обычная Е.Г. Применение антиоксидантов в педиатрической практике // *Consilium Medicum.* – 2003. – Т. 5, № 9. – Приложение Педиатрия.
10. Hochscheid R., Schuchmann U., Kotte E. NO₂-induced acute and chronic lung injury cause imbalance of glutathione metabolism in type II pneumocytes // *Med. Sci. Monit.* – 2005. – Vol. 11, № 8. – P. BR273-279.
11. Westergren-Thorsson G., Larsen K., Nihlberg K. et al. Pathological remodelling in inflammation // *Clin. Respir. J.* – 2010. – № 4. – Suppl. 1. – P. 1-8.
12. Zhang Y., Ma C., Xiao Y. et al. Dual role of vitamin C utilization in NO₂-induced oxidative stress in lung tissues of mice // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* – 2010. – Vol. 84, № 6. – P. 662-666.