

# МОДЕЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ IN VIVO

*Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Таганович А.Д.*

Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Считается, что свободнорадикальное окисление имеет отношение к патогенезу ряда хронических и острых повреждений легких (хроническая обструктивная болезнь легких, астма, муковисцидоз, инфекции, аспирационный синдром, бронхолегочная дисплазия и др.) [1]. При этом прямые доказательства причастности свободных радикалов к повреждению структур легких при патологических состояниях отсутствуют, поскольку нет методических приемов, которые позволили бы доказать, что именно свободные радикалы оказывают повреждающее действие на ткани легких при той или иной патологии. Представляется, что только в условиях модельного эксперимента можно получить убедительные аргументы, касающиеся взаимосвязи между данными явлениями и обоснованности применения антиоксидантов в качестве средств патогенетической терапии. Известны способы моделирования острого повреждения легких, которые, однако, не могут быть использованы для исследования состояний, сопровождающихся длительным оксидативным стрессом.

Цель исследования: разработать способ моделирования хронического окислительного повреждения легких in vivo.

Материалы и методы. Для стимуляции процессов пероксидации мы использовали смесь  $Fe^{2+}$ -аскорбат, которая неоднократно применялась в экспериментах на различных типах клеток в качестве индуктора генерации свободных радикалов [2-4], однако in vivo для стимуляции повреждения легких ранее не использовалась. Индукционную смесь, содержащую  $FeSO_4$  (0,2 ммоль/л, 0,4 мг/кг), аскорбиновую кислоту (2 ммоль/л, 2,5 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), рН=7,4, готовили непосредственно перед использованием и вводили морским свинкам ингаляционно с помощью компрессорного небулайзера Comp Air (Omron, Китай). Продолжительность одной ингаляции составляла в среднем 30

минут, общее число ингаляций - 14 (ежедневно в течение 14 дней).

По окончании эксперимента животных наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально). В качестве материала для исследования использовали бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ) и гомогенат легких. Мы изучали интенсивность генерации активных форм кислорода (АФК) клетками БАЛЖ (метод люминол-зависимой хемилюминесценции), клеточный состав БАЛЖ (в мазках после окраски по Романовскому-Гимзе), содержание общего белка (метод Лоури), сурфактантных фосфолипидов (тонкослойная хроматография), продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (спектрофотометрический метод), содержание нейтрофильной эластазы (ELISA) в легких опытных животных.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6,0. Данные опытной и контрольной групп сравнивали с использованием непараметрического U-теста Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (25 процентиль – 75 процентиль).

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ингаляционное введение индукционной смеси  $Fe^{2+}$ -аскорбат приводит к развитию окислительного стресса и развитию воспалительных изменений в легких. Содержание общего белка в БАЛЖ морских свинок в условиях индукции свободнорадикального окисления с использованием системы  $Fe^{2+}$ -аскорбат достоверно увеличивалось и составляло 220,2 (192,9 – 346,2) мг/л по сравнению с контролем 164,2 (113,3 – 192,5) мг/л,  $p < 0,05$ . Среди клеток БАЛЖ преобладали альвеолярные макрофаги, однако относительное содержание нейтрофилов было увеличено до 10,5 (8,0 – 13,5)% по сравнению с контролем (1,5 (0 – 2,0)%),  $p < 0,05$ .

Введение смеси  $Fe^{2+}$ -аскорбат в течение 14 суток сопровождалось суммарным усилением продукции АФК клетками БАЛЖ, в среднем, в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), что сопровождалось увеличением содержания в БАЛЖ продуктов ПОЛ, реагирующих с ТБК, до 7,25 (6,81 – 7,75) нмоль/мкмоль

общего липидного фосфора по сравнению с 4,52 (3,75 – 7,39) нмоль/мкмоль общего липидного фосфора в контроле ( $p < 0,05$ ).

В условиях моделирования свободнорадикального окисления с использованием системы  $Fe^{2+}$ -аскорбат выявлено снижение уровня фосфолипидов сурфактанта в БАЛЖ. Содержание общего липидного фосфора составило 814,3 (486,3 – 1007,5) нмоль фосфора/мг белка (44,2% от контроля,  $p < 0,05$ ), фосфатадилхолина (суммарного) – 604,6 (372,0 – 740,4) нмоль фосфора/мг белка (46,5% от контроля,  $p < 0,05$ ), дианасыщенного фосфатидилхолина – 430,5 (303,6 – 508,2) нмоль фосфора/мг белка (53,1% от контроля,  $p < 0,05$ ).

Содержание нейтрофильной эластазы в легких морских свинок после введения индукционной смеси  $Fe^{2+}$ -аскорбат в течение 14 дней составило 41,7 (23,8 – 60,0) пг/мг белка/г ткани, что в 3,1 раза выше, чем в контрольной группе (13,5 (10,2 – 19,2) пг/мг белка/г ткани,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, ингаляционное введение лабораторным животным смеси  $Fe^{2+}$ -аскорбат может использоваться для индукции процессов свободнорадикального окисления при изучении патогенетических механизмов и разработке способов коррекции патологических состояний, связанных с развитием оксидативного стресса в легких.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cienciewicki J., Trivedi S., Kleeberger S.R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol.122. – P.456-468.
2. Courtois F., Seidman E.G., Delvin E. et al. Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2003.- Vol.77. – P.744-750.
3. Marcil V., Lavoie J.C., Emonnot L. et al. Analysis of the effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage, antioxidant response and inflammation in THP-1 macrophages // *Clin. Bioch.* – 2011. – Vol.44. – P.873-883.
4. Martinez-Pastor F., Aisen E., Fernandez-Santos M. et al. Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa // *Reproduction.* – 2009. – Vol.137. – P.225-235.