

УДК 612.648.1.014.464.015.31:599.324.7

*И. Л. КОТОВИЧ, Ж. А. РУТКОВСКАЯ, А. Д. ТАГАНОВИЧ*

**СОСТОЯНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО И НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ЗВЕНЬЕВ  
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЛЕГКИХ  
У ПОВОРОЖДЕННЫХ МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИИ**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск*

*(Поступила в редакцию 29.06.2011)*

**Введение.** Одним из приоритетных направлений развития здравоохранения в Беларуси является обеспечение максимальной выживаемости недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. С учетом того, что для недоношенных характерны несформированность альвеол легких, утолщение и отек стенок воздухопроводящих путей [1], для обеспечения эффективного газообмена применяется длительная искусственная вентиляция легких (ИВЛ) с высокой концентрацией кислорода во вдыхаемой смеси. Нередко следствием такого «выхаживания» является развитие бронхолегочной дисплазии (БЛД) – тяжелого хронического заболевания, которое характеризуется формированием грубых фиброзных изменений в легких. Развитию БЛД могут способствовать: механическое повреждение легких при ИВЛ (баротравма, волномотравма), токсическое действие избытка кислорода, недостаточность антиоксидантных систем и незрелость легочной ткани [2].

Действие высоких доз кислорода приводит к повреждению легочных структур за счет увеличения продукции активных форм кислорода и развития оксидативного стресса. В таких условиях повреждающее действие свободных радикалов направлено на мембранные липиды и белки, ферменты и ДНК клеток. Тем не менее, в ряде исследований не было обнаружено стимуляции процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) и накопления продуктов перекисидации в легких под действием высоких доз кислорода [3].

Степень повреждения легких и других систем организма в условиях гипероксии зависит от состояния антиоксидантной системы. Легкие постоянно контактируют с кислородом и другими потенциальными оксидантами. Поэтому они обладают развитой и мощной системой ферментативной и неферментативной защиты. Большинство окислительных реакций протекает на границе воздух–эпителий, т. е. имеет внеклеточное происхождение. В связи с этим большое количество антиоксидантов присутствует в жидкости, выстилающей альвеолярный и бронхиальный эпителий. Отдельного внимания заслуживает наличие высоких концентраций восстановленного глутатиона (в 100 раз превышающих аналогичный показатель в плазме крови), аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, токоферола, обнаруживаются также секреторные внеклеточные формы супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП) [4, 5]. В литературе можно встретить данные о влиянии редокс-статуса клеток легких на синтез основных антиоксидантных ферментов на транскрипционном уровне [6, 7]. Однако, во-первых, индукция синтеза ферментов не всегда сопровождалась ростом их активности в тканях [8, 9], во-вторых, длительность воздействия высоких концентраций кислорода обычно не превышала трех суток.

Учитывая вышеизложенное, целью настоящего исследования было изучить влияние длительной гипероксии на содержание неферментативных антиоксидантов и активность ферментативных, а также на содержание продуктов окисления липидов и белков в легких.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты проводили на новорожденных морских свинках ( $n = 39$ ), находившихся на стандартном рационе вивария БГМУ, соблюдая этические

нормы и правила проведения работ с лабораторными животными. Животных опытных групп ( $n = 4-6$ ) в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 75% (температура 20–25 °С, относительная влажность 50–80%). Длительность гипероксии составляла 1, 3, 7 и 14 сут. Контрольные животные ( $n = 4-7$  в каждой группе) в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. По окончании инкубации животных обеих групп наркотизировали (тиопентал натрия в дозе 15 мг/кг интраперитонеально) и проводили промывание легких (трижды по 8 мл) раствором 0,9%-ного NaCl через эндотрахеальный зонд. Полученную лаважную жидкость центрифугировали (900 об/мин, 4 °С) для осаждения клеток и выделения альвеолярных макрофагов. В качестве материала для исследования использовали альвеолярные макрофаги, бесклеточный супернатант бронхоальвеолярной лаважной жидкости и гомогенаты легких. Определяли следующие показатели: активность основных антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы, ГП), содержание восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений, а также уровни альфа-токоферола и ретинола. Об интенсивности окислительных процессов судили по уровню карбонильных производных остатков аминокислот (окислительная модификация белков) и продуктов ПОЛ (представленных в основном малоновым диальдегидом), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

*Общий белок* определяли по методу Lowry [10].

Степень разведения бронхоальвеолярной жидкости (БАЖ) оценивали по содержанию мочевины [11] и учитывали при расчетах.

*Активность СОД* определяли в альвеолярных макрофагах и внесклеточной жидкости непрямим спектрофотометрическим методом с использованием наборов фирмы «Анализ Х» (Беларусь). В основе метода – ингибирование супероксидзависимого окисления кверцетина в присутствии СОД. Активность фермента выражали в  $\text{мЕ} \cdot \text{мг белка}^{-1}$  или в  $\text{мЕ} \cdot \text{мг белка}^{-1} \cdot \text{мл БАЖ}^{-1}$ .

*Активность каталазы* в альвеолярных макрофагах определяли спектрофотометрическим методом [12]. В основе метода лежит способность пероксида водорода образовывать стабильный окрашенный комплекс с молибдатом аммония, который регистрируется при 410 нм. В присутствии каталазы пероксид водорода расщепляется и окраска ослабевает. Активность фермента выражали в  $\text{мЕ} \cdot \text{мг белка}^{-1}$ .

*Активность ГП* в альвеолярных макрофагах и внесклеточной жидкости определяли по методу В. М. Моина [13]. Скорость глутатионпероксидазной реакции оценивали по количеству непрореагировавшего восстановленного глутатиона, который определяли реакцией с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ). Количество образовавшегося при этом окрашенного продукта измеряли спектрофотометрически при 412 нм. Активность ГП выражали в  $\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$  или в  $\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1} \cdot \text{мл БАЖ}^{-1}$ .

*Определение содержания восстановленного глутатиона* и других небелковых SH-соединений проводили по методу J. Sedlak [14]. В основе метода лежит реакция взаимодействия SH-групп глутатиона с ДТНБ с образованием 2-нитро-5-меркаптобензойной кислоты, способной поглощать свет с длиной волны 412 нм. Содержание восстановленного глутатиона в альвеолярных макрофагах и внесклеточной жидкости выражали в  $\text{нмоль} \cdot \text{мг белка}^{-1}$  и в  $\text{нмоль} \cdot \text{мг белка}^{-1} \cdot \text{мл БАЖ}^{-1}$  соответственно.

*Содержание альфа-токоферола и ретинола* определяли флюориметрическим методом [15] в гомогенатах легких животных и плазме крови и выражали в  $\text{нмоль} \cdot \text{г ткани}^{-1}$  и  $\text{мкмоль} \cdot \text{л плазмы}^{-1}$  соответственно.

В бронхоальвеолярной лаважной жидкости и гомогенатах легких определяли *содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты)*, используя метод M. Oikawa [16]. Метод основан на взаимодействии малонового диальдегида с ТБК с образованием триметинового комплекса розового цвета. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически при 532 нм. При расчете использовали коэффициент молярной экстинкции, равный  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , содержание выражали в  $\text{нмоль} \cdot \text{мг белка}^{-1}$  или в  $\text{нмоль} \cdot \text{г ткани}^{-1}$ .

*Определение окислительной модификации белков* проводили по методу, описанному Е. Е. Дубиной [17]. Метод основан на реакции взаимодействия карбонильных производных окисленных

аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином. Образование окрашенных 2,4-динитрофенилгидразонов регистрировали спектрофотометрически при 360 нм. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции  $22 \cdot 10^3$  моль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Содержание карбонильных производных выражали в нмоль·мг белка<sup>-1</sup>.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости  $P < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов, охватывающих 50% наблюдений.

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что содержание основных антиоксидантов в легких постепенно увеличивается в период гестации и продолжает увеличиваться после рождения [18]. В нашем исследовании анализируемые показатели у групп животных разного возраста также существенно отличались. В связи с этим для каждой опытной группы использовался свой контроль. Для наглядности на диаграммах большинство показателей, характерных для животных опытных групп, представлено в процентах от соответствующих контрольных значений.

*Изменение содержания основных внеклеточных антиоксидантов в условиях гипероксии.* У животных, находившихся в условиях гипероксии, было выявлено достоверное ( $P < 0,05$ ) снижение уровня восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений в БАЖ (рис. 1). Уже спустя сутки их содержание составляло 76% от контрольных значений, а в дальнейшем еще больше снижалось (до 25% от контроля на 14-е сутки).

Активность СОД в БАЖ достоверно ( $P < 0,05$ ) снижалась в первые сутки воздействия высокой концентрации кислорода, в среднем на 31,5% (см. таблицу). У животных, находившихся в условиях гипероксии в течение более длительного времени (7 сут), активность данного фермента соответствовала контрольным значениям, а через 14 сут после воздействия гипероксии вновь имела тенденцию к снижению, которая, однако, не была статистически достоверна. По данным других исследователей, влияние гипероксии *in vitro* вызывает индукцию синтеза антиоксидантных ферментов, в частности СОД и ГП, на уровне транскрипции за счет активации транскрипционных факторов NF-κB и Activator Protein 1 (AP-1) [6, 7]. Характер изменения активности СОД в нашем исследовании также предполагает индукцию синтеза данного фермента. По нашему мнению, именно этим можно объяснить поддержание его активности на уровне контрольных значений у животных, находившихся под влиянием гипероксии в течение 7 и 14 сут.

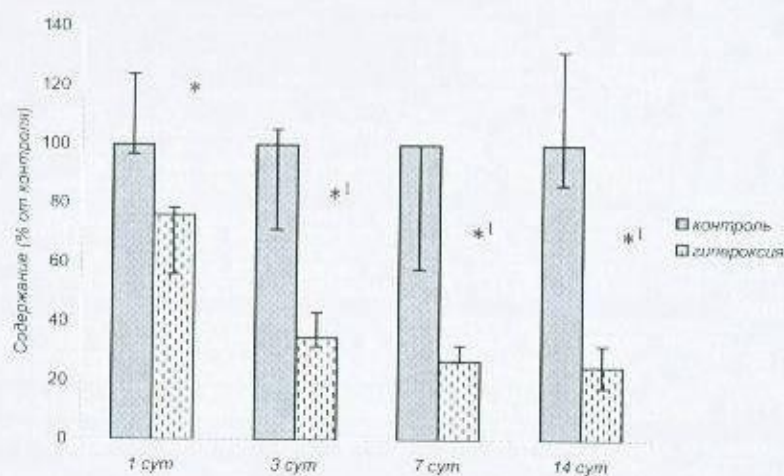


Рис. 1. Содержание восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений в БАЖ поворожденных морских свинок в динамике гипероксии. Достоверность различий ( $P < 0,05$ ): \* – по сравнению с контролем, \*1 – по сравнению с опытной группой «1 сут»

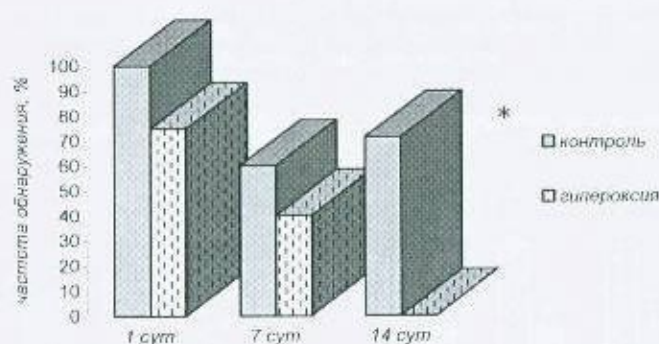
Активность супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП) в бронхоальвеолярной жидкости новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

Показатель	Время воздействия, сут	Контроль	Гипероксия
СОД, мЕ·мг белка <sup>-1</sup> ·мл БАЖ <sup>-1</sup>	1	402,8 (381,5–436,7)	275,6 (224,0–352,9)*
	7	458,7 (232,4–476,3)	471,7 (381,2–549,9)
	14	576,0 (511,5–668,8)	443,2 (339,1–561,8)
ГП, нмоль мин <sup>-1</sup> ·мг белка <sup>-1</sup> ·мл БАЖ <sup>-1</sup>	1	955,5 (394,5–1363,5)	389,9 (75,5–714,7)
	7	820,9 (0,0–933,6)	760,9 (0,0–2311,5)
	14	233,5 (0,0–1453,8)	0,0

Примечание. Данные представлены в виде медианы (25–75-й процентиль); \* –  $P < 0,05$  по сравнению с контролем.

Активность ГП в БАЖ животных опытных групп имела отчетливую тенденцию к снижению. Традиционное сравнение опытной и контрольной групп не смогло выявить достоверных отличий в связи с тем, что показатели очень сильно варьировались даже в пределах одной исследуемой группы, а зачастую активность фермента вообще не удавалось зарегистрировать. Во всех опытных пробах, которые были получены после двухнедельного воздействия гипероксии, активность ГП не определялась, тогда как в большинстве контрольных проб она регистрировалась. В этой ситуации мы проанализировали так называемую «частоту встречаемости признака». Оказалось, что в опытных пробах по мере увеличения продолжительности воздействия гипероксии ГП обнаруживается в БАЖ значительно реже, чем в контрольных (рис. 2, а). И если на 1-е и 7-е сутки данная тенденция была недостоверна, то на 14-е сутки расчет точного критерия Фишера показал наличие взаимосвязи между длительной гипероксией и падением активности ГП в БАЖ ( $P = 0,045$ ) (рис. 2, б).

а



б

Время воздействия	Группа	ГП(+)		ГП(-)		Всего	Точный критерий Фишера
		n	%	n	%		
1 сут	Контроль	4	100	0	0	4	$P = 0,500$
	Гипероксия	3	75	1	25	4	
7 сут	Контроль	3	60	2	40	5	$P = 0,500$
	Гипероксия	2	40	3	60	5	
14 сут	Контроль	5	71	2	29	7	$P = 0,045$
	Гипероксия	0	0	4	100	4	

Рис. 2. Частота выявления активности глутатионпероксидазы в БАЖ новорожденных морских свинок (а) и расчет точного критерия Фишера для экспериментальных групп (б). ГП (+) – наличие активности глутатионпероксидазы в БАЖ, ГП (-) – активность глутатионпероксидазы (не регистрировалась)

**Содержание основных антиоксидантов в альвеолярных макрофагах в условиях гипероксии.** Нами не выявлено достоверных отличий активности основных антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы и ГП) в альвеолярных макрофагах контрольных и опытных животных, которые инкубировались в условиях гипероксии в течение 1, 3 и 7 сут (рис. 3). Можно отметить лишь тенденцию к первоначальному снижению активностей СОД и ГП (вероятно, вследствие окислительного повреждения молекул фермента) с последующим их возрастанием до уровня контроля, что может быть обусловлено увеличением продукции супероксидного анион-радикала и других активных форм кислорода макрофагами и индукцией синтеза данных ферментов в условиях гипероксии. На 14-е сутки активность всех ферментов резко снизилась (СОД – на 40%, каталазы – на 60, ГП – почти на 70%). Содержание восстановленного глутатиона в альвеолярных макрофагах опытных животных достоверно не изменялось ( $P = 0,5$ , данные не представлены).

Одной из причин обнаруженного снижения активности антиоксидантных ферментов, особенно выраженного при длительной гипероксии, может быть окислительная модификация белков. Уровень карбонильных производных в белках БАЖ уже через 3 сут воздействия высокой концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе был в 1,5 раза выше, чем в контроле (рис. 4, а).

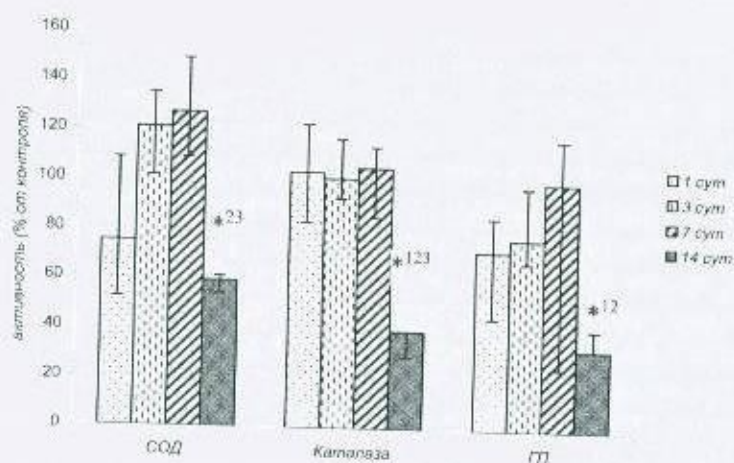


Рис. 3. Изменение активности антиоксидантных ферментов в альвеолярных макрофагах в условиях гипероксии. Данные соответствующих контрольных групп приняты за 100%. Достоверность различий ( $P < 0,05$ ): \* – по сравнению с контролем, <sup>1</sup> – по сравнению с опытной группой «1 сут»; <sup>2</sup> – по сравнению с опытной группой «3 сут»; <sup>3</sup> – по сравнению с опытной группой «7 сут»

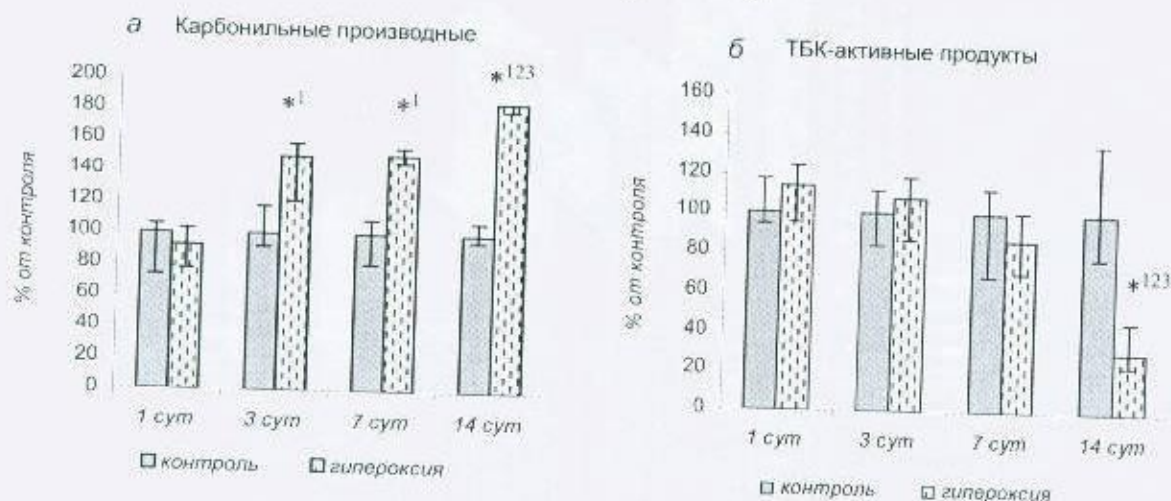


Рис. 4. Содержание карбонильных производных аминокислотных остатков в белках (а) и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (б) в бронхоальвеолярной жидкости в условиях гипероксии. Достоверность различий ( $P < 0,05$ ): \* – по сравнению с контролем; <sup>1</sup> – по сравнению с опытной группой «1 сут»; <sup>2</sup> – по сравнению с опытной группой «3 сут»; <sup>3</sup> – по сравнению с опытной группой «7 сут»

В дальнейшем описанные изменения сохранялись, а на 14-е сутки даже имели тенденцию к нарастанию.

*Содержание основных неферментативных антиоксидантов в легких и плазме крови в условиях гипероксии.* Исследовано содержание в плазме крови и в легких опытных животных витаминов антиоксидантного действия – ретинола и альфа-токоферола. Уровень ретинола в плазме на 7-е сутки воздействия гипероксии достоверно снижался, в среднем на 21% (рис. 5). Достоверных изменений в содержании ретинола в гомогенатах легких под влиянием гипероксии не выявлено ( $P = 0.2$ ).

На 7-е сутки воздействия гипероксии в легких опытных животных существенно увеличилась концентрация альфа-токоферола (в 2,5 раза по сравнению с контролем) (рис. 6), а в плазме крови его уровень имел тенденцию к снижению. В то же время вдыхание смеси с высоким содержанием кислорода в течение 14 сут приводило к достоверному ( $P < 0,05$ ) уменьшению содержания токоферола как в плазме крови, так и в легких (в среднем на 35%). На основании полученных данных можно предположить, что в связи с увеличением потребностей в антиоксидантах спустя неделю после воздействия гипероксии происходит перераспределение фонда токоферола

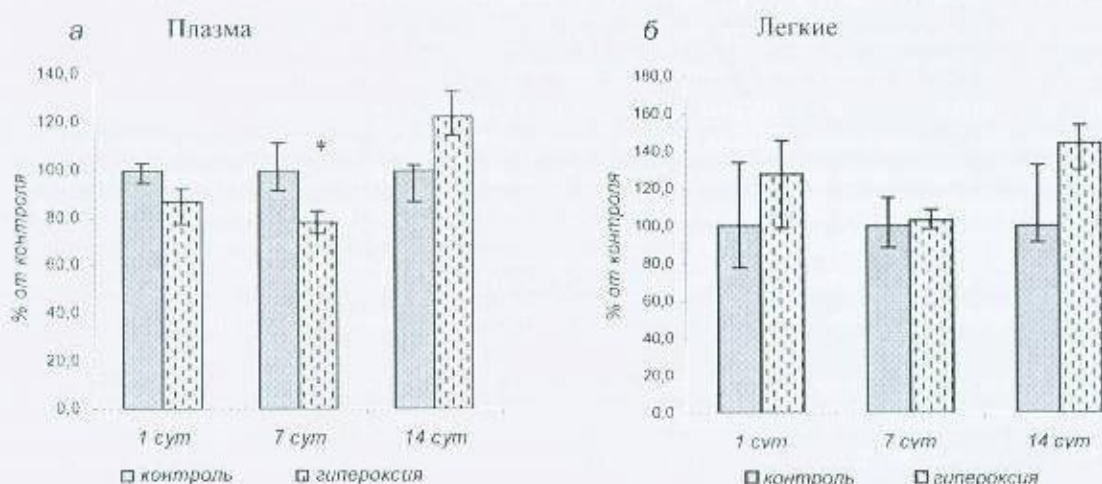


Рис. 5. Содержание ретинола в плазме крови и легких животных в условиях гипероксии. \* –  $P < 0,05$  по сравнению с контролем

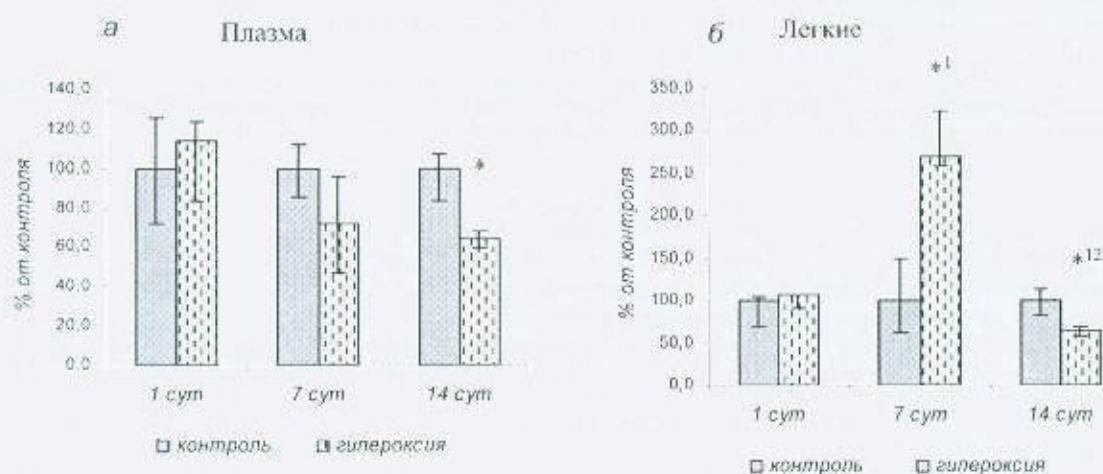


Рис. 6. Содержание альфа-токоферола в плазме крови и легких животных в условиях гипероксии. Данные соответствующих контрольных групп приняты за 100%. Достоверность различий ( $P < 0,05$ ): \* – по сравнению с контролем; <sup>1</sup> – по сравнению с опытной группой «1 сут»; <sup>2</sup> – по сравнению с опытной группой «7 сут»

в организме с накоплением его в легочной ткани. Дальнейшее воздействие гипероксии существенно сокращает резервы токоферола.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о постепенном истощении в легких системы как неферментативных, так и ферментативных антиоксидантов под влиянием гипероксии. В таких условиях молекулярно-клеточные структуры в альвеолярном пространстве чрезвычайно чувствительны к окислительному повреждению. Крайне неблагоприятным является резкое снижение активности ГП, поскольку этот фермент способен обезвреживать не только перекись водорода, но и органические гидроперекиси, включая перекиси ненасыщенных жирных кислот [17]. В связи с этим логично было ожидать активации процесса ПОЛ в легких опытных животных, однако не был обнаружен прирост количества ТБК-активных продуктов в БАЖ. Более того, у животных опытной группы после 14-суточной гипероксии уровень ТБК-активных продуктов оказался даже ниже, чем в контроле (см. рис. 4, б).

В ткани легких содержание ТБК-активных продуктов не отличалось от контрольных значений. Причиной подобного «несоответствия», как нам представляется, является изменение при гипероксии количества источников продуктов ПОЛ в альвеолярном пространстве – фосфолипидов легочного сурфактанта. В ходе проведенных экспериментов получены сведения (не приведены в данной публикации) о том, что на 14-е сутки уровень фосфолипидов в БАЖ у опытных животных был в 3 раза ниже, чем у контрольных. Кроме того, увеличивалась доля динасыщенных форм фосфатидилхолина, которые наименее подвержены окислению. Если исходить из этого обстоятельства, содержание ТБК-активных продуктов в БАЖ не отражает в полной мере интенсивность окислительных процессов в легких. Кроме того, длительное сохранение на высоком уровне токоферола в легких (как показано ранее) может препятствовать стимуляции ПОЛ и накоплению продуктов липопероксидации.

**Заключение.** Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях длительной гипероксии происходит постепенное истощение возможностей антиоксидантных систем в легких:

на 14-е сутки воздействия высоких доз кислорода снижается активность основных внутриклеточных антиоксидантных ферментов в альвеолярных макрофагах (в наибольшей степени – ГП); во внеклеточной жидкости активность ГП не определяется, а активность СОД сохраняется на уровне контрольных значений;

в условиях гипероксии количество карбонильных производных в белках увеличивается, что свидетельствует об окислительном повреждении белковых молекул и может являться причиной уменьшения активности ферментов;

в БАЖ в условиях гипероксии значительно уменьшается количество небелковых SH-соединений (восстановленного глутатиона); через 2 недели воздействия гипероксии снижается содержание альфа-токоферола в легких и плазме крови;

уровень продуктов ПОЛ в легких животных, подвергнутых гипероксии, не увеличивается, возможной причиной чего может быть снижение концентрации сурфактантных фосфолипидов.

## Литература

1. Post M., Copland I. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2002. Vol. 23, Suppl. P. 4–7.
2. Шижко Г.А., Устинович Ю.А. Современные подходы к ранней диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии: учеб.-метод. пособие для врачей. Минск, 2006.
3. Törlle A., Kolleck I., SchTame M. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. Vol. 1346, N 2. P. 198–204.
4. Avissar N., Finkelstein J.N., Horowitz S. et al. // *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)* 1996. Vol. 270. P. L173–L182.
5. Nozik-Grayck E., Dieterle C.S., Piantadosi C.A. et al. // *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)* 2000. Vol. 279. P. L977–L984.
6. Comhair S.A.A., Thomassen M.J., Erzurum S.C. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000. Vol. 23. P. 350–354.
7. Kinnula V.L., Crapo J.D. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003. Vol. 167. P. 1600–1619.
8. Ho Y.S., Dey M.S., Crapo J.D. // *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)* 1996. Vol. 270. P. L810–L818.
9. Mamò L.B., Suliman H.B., Giles B.-L. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004. Vol. 170. P. 313–318.

10. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. // *J. Biol. Chem.* 1951, Vol. 2, P. 265-275.
11. Rennard S.L., Basset G., Lecossier D. et al. // *J. Appl. Physiol.* 1986, Vol. 60, P. 532-538.
12. Мамонтова Н.С., Белобородова Э.И., Тюкалова Л.И. // *Клин. лаб. диагностика.* 1994, № 1, С. 27-28.
13. Моин В.М. // *Лаб. дело.* 1986, № 12, С. 724-727.
14. Sedlak J., Lindsay R.H. // *Anal. Biochem.* 1968, Vol. 25, N 1, P. 192-205.
15. Тарасюк И.В., Юрага Т.М., Станкевич С.И. и др. Методика определения содержания альфа-токоферола и ретинола в сыворотке (плазме) крови: инструкция по применению. Минск, 2008.
16. Oikawa M., Ohsa N. // *Anal. Biochem.* 1979, Vol. 95, N 2, P. 351-358.
17. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток: жизнь и смерть, созидание и разрушение. СПб., 2006.
18. Asikainen T.M., Raivio K.O., Saksela M. et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998, Vol. 19, P. 942-949.

*I. I. KOTOVICH, Zh. A. RUTKOVSKAYA, A. D. TAGANOVICH*

**STATE OF ENZYMATIC AND NON-ENZYMATIC CHAINS OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM  
IN LUNGS OF NEWBORN GUINEA PIGS UNDER PROLONGED HYPEROXIA**

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Summary**

The aim of the present research was to study the influence of prolonged hyperoxia on characteristics of non-enzymatic and enzymatic antioxidant systems, the content of lipid and protein oxidation products in lungs. Results of experimental research showed the decrease of the activity of the main antioxidant enzymes in alveolar macrophages, the significant reduction of non-protein SH-compounds (reduced glutathione) and glutathione peroxidase in bronchoalveolar fluid, the lowered level of plasma and lung alpha-tocopherol under prolonged hyperoxia. Protein carbonyls, but not lipid peroxidation products, increase in bronchoalveolar fluid, indicating oxidative damage of proteins that can be the cause of an enzyme activity decrease.