

## РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У РОЗВИТКУ І ПРОГРЕСУВАННІ ГОСТРОГО УРАЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

*В експериментах на щурах-самцях доведено, що в міру прогресування НСІ-індукованого гострого ураження легень як у крові, так і в бронхоальвеолярному змиві достовірно зростає рівень активних форм кисню.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** гостре ураження легень, активні форми кисню, кров, бронхоальвеолярний змив.

**ВСТУП.** Респіраторний відділ легень є важливим компонентом системного гомеостазу, який при багатьох патологічних станах, незважаючи на ряд деструктивних і дистрофічних змін у своєму складі, проявляє широкі компенсаторні властивості. Провідне значення у розвитку ускладнень і летальних наслідків належить тяжким прогресуючим респіраторним порушенням, що є одним із компонентів синдрому поліорганної недостатності [11].

Метаболізм клітини в більшості випадків залежить від характеру інформації, яку несуть первинні месенджери – цитокіни. ФНП- $\alpha$ , як і ІЛ-1 $\beta$ , активує НАДФН-оксидази нейтрофільних гранулоцитів, які окиснюють НАДФН до НАДФ<sup>+</sup> за рахунок відновлення O<sub>2</sub> до супероксидного аніон-радикала. Ферментативна генерація супероксидного аніон-радикала в організмі людини здійснюється також ксантиноксидазою, цитохромом P450, альдегідоксидазою, ліпоксигеназою, циклооксигеназою нейтрофілів і моноцитів [6, 9]. У результаті виникає так званий кисневий спалах, який зумовлений активними формами кисню (АФК), серед яких мієлопероксидаза каталізує реакцію утворення гіпохлориту з аніона хлору і пероксиду водню, а також відбувається утворення гідроксильного радикала з пероксиду водню і гіпохлориту за присутності іонів заліза [5, 8]. Дисмутація супероксидних аніон-радикалів під дією супероксиддисмутази у біологічних тканинах спричиняє утворення пероксиду водню, який здатний легко проникати через мембрани клітин [7, 14].

© М. І. Марущак, 2012.

Розвиток і прогресування гострого ураження легень (ГУЛ) певним чином залежать від функціональної активності нейтрофілів, функція яких – фагоцитоз і продукція активних форм кисню. В результаті нейтрофіли стають основним джерелом АФК, а їх гіперпродукція може призводити до порушення функцій, пошкодження і смерті клітини внаслідок розвитку окисного стресу [3, 10, 13]. Отримані попередньо результати дозволяють говорити про регіонарну секвестрацію нейтрофілів у легенях за умов ГУЛ та гострого респіраторного дистрес-синдрому. Внаслідок цього в периферичній крові має місце зменшення нейтрофілів, що зумовлює зниження метаболічного резерву нейтрофілів периферичної крові [4].

Метою даного дослідження було з'ясувати роль активних форм кисню в нейтрофілах крові та гомогенату легень експериментальних тварин у патогенезі розвитку гострого ураження легень.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди було проведено на 60 білих статевозрілих нелінійних щурах масою 200–220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського. Тварин поділили на 5 груп: 1-ша – контрольна група (n=12); 2-га – моделювання ГУЛ, спостереження через 2 год (n=12); 3-тя – моделювання ГУЛ, спостереження через 6 год (n=12); 4-та – моделювання ГУЛ, спостереження через 12 год (n=12); 5-та – моделювання ГУЛ, спостереження через 24 год (n=12).

Для дослідження вибрали нейтрофілоза-лежну експериментальну модель ГУЛ [12]. Щурів анестезували шляхом внутрішньочеревного введення тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Вентральну сторону шиї обробляли хлоргексидином, і робили 0,5 см серединний розріз для візуалізації трахеї. Тварин розміщували горизонтально під кутом 45°, інсуліновим шприцом вводили в трахею HCl, pH=1,2, в дозі 1,0 мл/кг на вдиху. Щурам контрольної групи вводили фізіологічний розчин в аналогічній дозі.

Через 2, 6, 12 і 24 год тварин знову анестезували тіопенталом натрію в дозі 90 мг/кг маси тварини. Для одержання бронхоальвеолярного змиву (БАЗ) щурам вводили інтра-трахеально 2 мл стерильного фізіологічного розчину, який через 1 хв забирали. Дану процедуру повторювали 3 рази. Отриманий БАЗ центрифугували протягом 10 хв при 3000 об. Супернатант збирали для наступних досліджень, а з одержаного осаду виділяли нейтрофіли. АФК досліджували в нейтрофілах гепаринізованої цільної крові та БАЗ. Популяцію нейтрофілів отримували за допомогою центрифугування на подвійному градієнті щільності 1,077 і 1,093 фіколу-верографіну. Після 40 хв центрифугування при температурі 4 °C і швидкості 1500 об./хв утворювалися дві інтерфази. Верхня інтерфаза (на межі плазма-верифікол щільністю 1,077) складалася з мононуклеарних клітин – 80 % лімфоцитів, 15–18 % моноцитів і незначного (2–3 %) додатка гранулоцитів. Нижня інтерфаза (на межі градієнтів розчинів щільністю 1,077–1,092) являла собою на 98–100 % популяцію нейтрофілів. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім складала 98–99 %. Аналіз зразків клітин проводили на проточному цитометрі “Epics XL” (“Beckman Coulter”, США) за допомогою гістограм та відповідних їм вікон статистики, що містили показники середньої геометричної інтенсивності світіння мічених клітин. Значення досліджуваного параметра виражали у відсотках (інтенсивність світіння на клітину).

Барвник ДХФ-ДА є неполярною сполукою. Пасивно проникаючи в клітину, він гідролізується естеразами (відщеплюються ацетатні групи) і перетворюється в полярну сполуку, яка не здатна дифундувати назад з клітини, – 2,7-дигідродихлорфлуоресцеїн. За присутності внутрішньоклітинних активних форм кисню, головним чином після реакції з пероксидом водню, що утворюється під час респіраторного “вибуху”, 2,7-дигідродихлорфлуоресцеїн окиснюється до 2,7-дихлорфлуоресцеїну, який є флуоресціюючою сполу-

кою в ділянці зеленого спектра, що дозволяє аналізувати клітини за інтенсивністю світіння барвника (FL-1 канал) за допомогою проточної цитометрії.

Статистичну обробку отриманих даних проведено стандартними методами варіаційної статистики з використанням пакета статистичних програм. Результати наведено як  $(M \pm m)$ , де  $M$  – середнє значення показника,  $m$  – стандартна похибка. Достовірність розбіжностей між досліджуваними показниками визначали за допомогою двовибіркового критерію Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати проведеного нами дослідження вказали на те, що в першу фазу (перші 2 год пошкодження) ГУЛ у крові експериментальних тварин спостерігалось достовірне зростання рівня АФК нейтрофілів ( $p < 0,01$ ) до  $(71,43 \pm 0,60)$  % порівняно з даними контролю –  $(40,79 \pm 0,81)$  %, причому такий високий рівень кисневих радикалів відмічено протягом 24 год спостереження (рис. 1). Так, у 3-й дослідній групі відсоток АФК збільшився на 9,5 % порівняно з 2-ю групою, а в 4-й – на 4,6 % відносно отриманих результатів 3-ї групи. Через 24 год після моделювання HCl-індукованого ГУЛ рівень АФК достовірно зріс на 75,12 % стосовно даних контрольної групи ( $p < 0,01$ ). Проводячи статистичну обробку даних, ми дійшли висновку, що АФК у крові щурів з HCl-індукованим ГУЛ практично відразу реагують з молекулами, які контактують з ними, зокрема з білками, мембранними ліпідами, причому їх високий рівень зберігається протягом перших 24 год експерименту. Звертає на себе увагу досить високе значення АФК у контрольній групі. Проте АФК не лише проявляють цитотоксичну дію, але й можуть бути вторинними месенджерами при

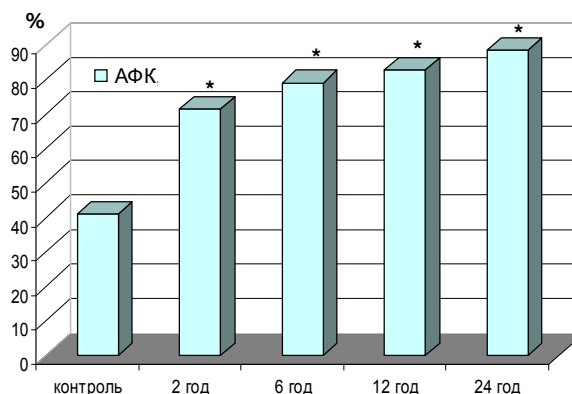


Рис. 1. Рівень активних форм кисню в нейтрофільних гранулоцитах крові при HCl-індукованому гострому ураженні легень (\* –  $p < 0,01$  порівняно з контролем).

підтримці фізико-хімічних властивостей біологічних мембран, а також у регуляції таких клітинних реакцій, як проліферація, диференціювання та апоптоз [2].

Будь-які органи можуть постраждати від окисного ураження, проте легені найбільш уразливі в цьому відношенні, оскільки в них підвищена можливість перебігу вільнорадикальних процесів. Тканина легень містить у надлишку ненасичені жирні кислоти, які є субстратом для перекисного окиснення ліпідів. Важливо, що в патогенезі HCl-індукованого ГУЛ важливе місце займає акумуляція активованих нейтрофілів у капілярній сітці альвеол, які є джерелом АФК [4, 5].

При проведенні аналізу рівня АФК нейтрофільних гранулоцитів у БАЗ було встановлено, що відсоток кисневих радикалів різко зростає уже на 2 годину експерименту на 106 % ( $p < 0,01$ ) (рис. 2). Потрібно зауважити, що рівень АФК був високим у всіх групах спостереження. Так, у 3-й дослідній групі даний показник достовірно збільшився, порівняно з контролем, у 2,22 раза ( $p < 0,001$ ) та в 1,08 раза відносно даних 2-ї групи ( $p < 0,01$ ). Аналізуючи отримані результати у двох останніх експериментальних групах, ми відмітили достовірне зростання рівня АФК відповідно до даних контрольної групи. Зіставляючи отримані результати в 4-й та 5-й групах, встановили, що різниця між показниками не була статистично значимою, хоча достовірно відрізнялась від даних контрольної групи ( $p < 0,001$ ) (4-та дослідна група:  $91,88 \pm 0,66$  % , 5-та дослідна група:  $95,33 \pm 0,97$  % проти  $39,29 \pm 0,65$  % – контроль). Важливо відмітити, що власне гіперпродукція АФК у нейтрофільних гранулоцитах може зумовлювати функціональні порушення

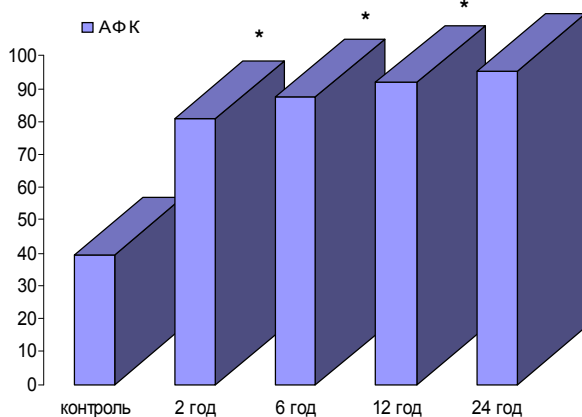


Рис. 2. Рівень активних форм кисню в нейтрофільних гранулоцитах бронхоальвеолярного змиву при HCl-індукованому гострому ураженні легень, % (\* –  $p < 0,001$  порівняно з контролем).

клітини і, як наслідок, смерть клітини в результаті розвитку окисного стресу.

Окисне ураження є результатом окисного стресу, коли порушується баланс прооксидантно-антиоксидантної системи. У попередніх дослідженнях ми довели, що при експериментальному ГУЛ, індукованому інтратрахеальним введенням хлоридної кислоти, спостерігається інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення: рівень ТБК-активних продуктів у гомогенаті легень перевищував приблизно на 37 % показники попередньої дослідної групи, тоді як у сироватці крові він також зростає, але менше (на 24 %) [1]. Встановлено, що в нейтрофілах до 90 % кисню, який споживається, витрачається на утворення  $O_2^-$  і  $H_2O_2$  [9]. Одним із проявів токсичної дії метаболітів кисню є інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення, що проявляється зростанням рівня малонового діальдегіду.

Важливим є зіставлення результатів визначення рівня АФК нейтрофілів у крові та БАЗ щурів з модельованим гідрохлоридним ГУЛ (рис. 3). Досліджено, що зміни кисневих радикалів відбувались однонаправлено у бік поглиблення окисного стресу. При цьому в 2-й групі рівень АФК у БАЗ був на 13,38 % вищим порівняно з даними цієї ж групи у крові, в 3-й та 4-й групах у БАЗ – приблизно на 11,0 % більшим, ніж у крові, в 5-й групі в БАЗ – на 7,62 % переважав дані цієї ж групи в крові. Найбільш значиме зростання АФК як у крові, так і в бронхоальвеолярному змиві відмічено через 2 год спостереження. В міру прогресування ГУЛ рівень АФК залишався достовірно високим стосовно даних контрольної групи, проте був статистично менш значимим у 3-й, 4-й та 5-й експериментальних групах.

Наші дані підтверджують те, що при ГУЛ, модельованому інтратрахеальним введенням

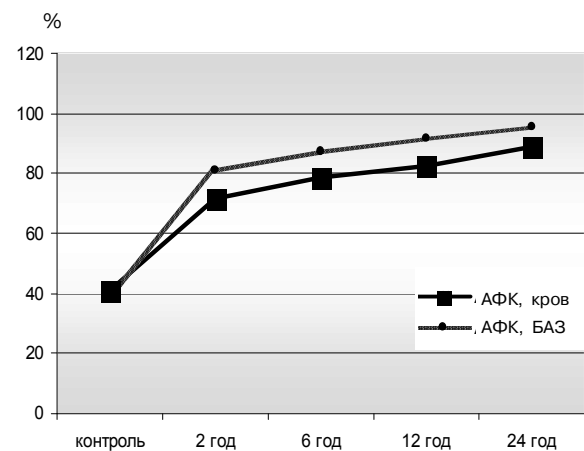


Рис. 3. Направленість змін активних форм кисню нейтрофілів у крові й бронхоальвеолярному змиві.

гідрохлоридної кислоти, у легенях більш виражений окисний стрес, ніж у системному кровотоці. Враховуючи основну функцію нейтрофілів – фагоцитоз, вони швидко мігрують у зону ураження при появі певного патологічного чинника. Гідрохлоридна кислота, яка в даній моделі ГУЛ є оксидантом, викликає в легенях полімеризацію актину нейтрофілів і знижує їх здатність до деформації, що зумовлює адгезію гранулоцитів до ендотелію. Накопичення активованих нейтрофілів у капілярній сітці альвеол та адгезія їх до ендотелію супроводжуються генерацією АФК, що призводить

до окисного стресу, наслідком якого є руйнування структурних елементів альвеол.

**ВИСНОВКИ.** 1. При HCl-індукованому гострому ураженні легень як у крові, так і в бронхоальвеолярному змиві достовірно зростає рівень активних форм кисню у міру прогресування захворювання.

2. При зіставленні результатів визначення рівня АФК нейтрофілів у крові та гомогенаті легень щурів з модельованим гідрохлоридним ГУЛ виявлено синхронний розвиток окисного стресу на системному і місцевому рівнях з переважанням легеневого окисного спалаху.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гришук Л. А. Динаміка перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в щурів за умов гострого ураження легень / Л. А. Гришук, М. І. Марущак // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2011. – № 2 (05). – С. 16–20.
2. Куликов В. Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани (обзор) / В. Ю. Куликов // Медицина и образование в Сибири. – 2009. – № 4. – С. 47–58.
3. Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс / Е. Б. Меньшикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков // Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
4. Патогенетична роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку гострого ураження легень / А. А. Гудима, М. І. Марущак, Г. Г. Габор, М. І. Куліцька // Буковин. мед. вісник. – 2011. – **15**, № 3. – С. 82–86.
5. Asai T. The specific free radical scavenger edaravone suppresses bleomycin-induced acute pulmonary injury in rabbits / T. Asai, Y. Ohno, S. Minatoguchi [et al.] // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2007. – **34**. – P. 22–26.
6. De Dooy J. J. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates / J. J. De Dooy, L. M. Mahieu, H. P. Van Bever // Eur. J. Pediatr. – 2001. – **160**. – P. 457–463.
7. Human TNF-alpha in transgenic mice induces differential changes in redox status and glutathione-regulating enzymes / H. Glosli, K. J. Tronstad, H. Wergedal [et al.] // FASEB J. – 2002. – **16**. – P. 1450–1452.
8. Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice / K. Tamagawa, Y. Taooka, A. Maeda [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000. – **161**. – P. 1279–1284.
9. Lee W. L. Neutrophil activation and acute lung injury / W. L. Lee, G. P. Downey // Curr. Opin. Crit. Care. – 2001. – **7**. – P. 1–7.
10. Maianski N. A. Apoptosis of neutrophils / N. A. Maianski, T. W. Kuijpers, D. Roos // Acta Haematologica. – 2004. – **111**. – P. 56–66.
11. Marshall J. C. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome / J. C. Marshall // Crit. Care Med. – 2001. – **29**. – P. 99–106.
12. Matute-Bello G. Animal models of acute lung injury / G. Matute-Bello, C. Frevert, T. Martin // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2008. – **295**. – P. 379–399.
13. Tiwari B. S. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death / B. S. Tiwari, B. Belenghi, A. Levine // Plant Physiology. – 2002. – **128**. – P. 1271–1281.
14. Tumor necrosis factor-alpha-mediated decrease in glutathione increases the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Y. Ishii, C. A. Partridge, P. J. Del Vecchio, A. B. Malik // J. Clin. Invest. – 1992. – **89**. – P. 794–802.

## РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РАЗВИТИИ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ ОСТРОГО ПОРАЖЕНИЯ ЛЕГКИХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

### Резюме

*В экспериментах на крысах-самцах доказано, что по мере прогрессирования HCl-индуцированного острого поражения легких как в крови, так и в бронхоальвеолярном смыве достоверно возрастает уровень активных форм кислорода.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** острое поражение легких, активные формы кислорода, кровь, бронхоальвеолярный смыв.

**M. I. Marushchak**  
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

## THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF AN ACUTE LUNG INJURY IN EXPERIMENT

### Summary

*In experiments on rats-males there has been proved that with the progression of HCl-induced acute lung injury both in the blood and bronchoalveolar lavage significantly increase the levels of reactive oxygen species.*

**KEY WORDS:** acute lung injury, reactive oxygen, blood, bronchoalveolar lavage.

Отримано 06.02.12

**Адреса для листування:** М. І. Марущак, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.