

ВЛИЯНИЕ ИММУНОСУПРЕССИИ НА ПНЕВМОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДИОКСИДА АЗОТА

Лебедева Е.С., Преображенская Т.Н., Двораковская И.В.

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, ул. Академика

Лебедева, 6. Тел. +7(812)542-20-91; e-mail: tanapp@yandex.ru

*Научно-исследовательский институт пульмонологии Санкт-Петербургского
государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-
Петербург, ул. Рентгена, 12. Тел. +7(812)449-68-40. E-mail: ele3260@yandex.ru*

Резюме. Проведено сравнительное исследование особенностей воспалительного бронхолегочного процесса, инициируемого длительным воздействием диоксида азота, у крыс с нормальной и сниженной иммунологической реактивностью. Угнетение иммунной реактивности организма с помощью иммуносупрессора циклофосамида модифицировало картину пневмотоксического эффекта диоксида азота. Усиливался приток в очаг воспаления нейтрофилов, отличающихся повышенной поглотительной способностью и высоким деструктивным потенциалом. Отмечалось стойкое увеличение содержания в крови высоко патогенных иммунных комплексов средней молекулярной массы. Обнаружение иммунных комплексов в бронхоальвеолярном пространстве после 30-дневной экспозиции диоксидом азота свидетельствовало о значительном повреждении альвеолярного эпителия. На фоне иммуносупрессии воспалительные изменения в легких под влиянием ингаляционного воздействия диоксида азота формировались значительно быстрее, чем у контрольных животных, и уже через месяц отмечались характерные черты ремоделирования легочной ткани с признаками эмфиземы, склероза и фиброзирования.
Ключевые слова: иммуносупрессия, диоксид азота, воспаление, иммунные комплексы, нейтрофилы.

INFLUENCE OF IMMUNOSUPPRESSION ON PNEUMOTOXIC EFFECT OF NITROGEN DIOXIDE

Lebedeva E.S., Preobrazhenskaya T.N., Dvorakovskaya I.V.

Summary. Features of inflammatory bronchopulmonary process initiated by prolonged exposure to nitrogen dioxide were investigated in rats with normal and reduced immune reactivity. Inhibition of immune reactivity with immunosuppressant cyclophosphamide modified

pneumotoxic effect of nitrogen dioxide. There was an increased influx of neutrophils into the inflammatory focus characterized by high absorptive capacity and high destructive potential. The significant stable increase in blood highly pathogenic immune complexes of medium molecular weight was observed. Detection of immune complexes in bronchoalveolar space after 30-day exposure to nitrogen dioxide indicated the significant damage of alveolar epithelium. In immunosuppressive rats inflammatory changes in lungs influenced by nitrogen dioxide inhalation were formed more rapidly than in control rats; signs of lung tissue remodeling (emphysema, sclerosis and fibrosis) were observed at 30-day exposure to nitrogen dioxide.

Key words: immunosuppression, nitrogen dioxide, inflammation, immune complexes, neutrophils.

Эпидемиологические и токсикологические исследования подтверждают связь между загрязнением городского воздуха поллютантами и возросшей частотой и тяжестью заболеваний органов дыхания, в первую очередь таких, как хроническая обструктивная болезнь легких и бронхиальная астма [1, 2, 3]. По значениям индекса загрязнения атмосферы в 69 % городов России с населением около 60 миллионов степень загрязнения воздуха оценивается как очень высокая и высокая, что означает превышение предельно допустимых концентраций примесей более чем в 10 раз [4]. Появилась целая группа экологически обусловленных заболеваний, среди которых доминируют болезни органов дыхания. Эти заболевания развиваются исподволь при ежедневном контакте с агрессивными факторами воздушной среды, и зачастую обращение к врачу происходит с запозданием при выраженных проявлениях болезни. Одним из основных антропогенных загрязнителей атмосферного воздуха крупных городов является диоксид азота, доля которого в общем выбросе автотранспорта, тепловых станций, котельных и прочих предприятий составляет 50-70 % [5, 6]. Ингаляционное воздействие диоксида азота может приводить как к острым, так и к хроническим эффектам на здоровье, особенно у восприимчивой части населения, к которой относятся люди со сниженной иммунологической реактивностью.

Цель исследования состояла в оценке особенностей формирования воспалительного бронхолегочного процесса у животных со сниженной иммунологической реактивностью в условиях длительного воздействия диоксида азота в концентрации, не оказывающей острого токсического эффекта на легочные структуры.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили крысы-самцы Вистар (n = 64) массой 160-180 г разводки питомника лабораторных животных

«Рапполово» РАМН (Всеволожский р-н Ленинградской обл.). Исследования проводились в соответствии с регламентом, установленным приказом МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 «Правила лабораторной практики». Для проведения ингаляционных затравок диоксидом азота крыс помещали в камеру, смонтированную в вытяжном шкафу, которая соединялась шлангом с лабораторной установкой для получения диоксида азота [7]. В результате химической реакции нитрита натрия с серной кислотой образовывалась смесь оксидов азота, которая по отводной трубке нагнеталась в камеру с животными. Под влиянием кислорода воздуха бесцветный оксид азота переходил в наиболее стабильный желто-бурый диоксид. Через специальное 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 на протяжении месяца подвергались воздействию диоксида азота в прерывистом режиме: три раза в день по 30 мин с получасовым интервалом между ингаляциями. При таких параметрах ингаляционного воздействия диоксида азота исключались острые токсические повреждения легких и образование метгемоглобина в количестве способном оказать влияние на развитие патологического процесса. С целью подавления иммунологической реактивности перед началом и в середине месячного цикла ингаляций крысам внутрибрюшинно вводили циклофосфамид (65 мг/кг, Аста Медика АГ, Германия), угнетающий продукцию антител и способность лимфоцитов (преимущественно В-клеток) к пролиферации, а животным контрольной группы – 0,9 % раствор хлорида натрия. Животных выводили из опыта после 15 и 30 дней ингаляционного воздействия диоксида азота, т.е. после одно- и двукратного введения циклофосфамида. Интактную группу составили крысы, не подвергавшиеся воздействию диоксида азота. Эвтаназию осуществляли внутрибрюшинным введением раствора тиопентала натрия (100 мг/кг).

Для забора материала животное размещали на операционном столике, вскрывали грудную полость. Пробу крови получали пункцией левого желудочка сердца, затем перевязывали трахею и извлекали легкие. Бронхоальвеолярный лаваж легких выполняли стерильным физиологическим раствором комнатной температуры: однократно в легкие вводили 4 мл раствора, процедуру повторяли 4-5 раз. Лаважную жидкость и кровь собирали в силиконизированные пробирки. Для гистологических исследований легкие, не подвергавшиеся лаважу, 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 жидкости

бронхоальвеолярного лаважа рассчитывали общее содержание клеток (в 1,0 мл) с помощью гемоцитометра и проводили дифференциальный клеточный анализ. Поглотительную способность фагоцитирующих клеток (альвеолярных макрофагов и нейтрофилов крови) определяли с использованием стандартных частиц латекса, рассчитывали фагоцитарное число (процент фагоцитирующих клеток) и фагоцитарный индекс (число частиц латекса, абсорбированных одним макрофагом). В сыворотке крови определяли содержание циркулирующих иммунных комплексов большой и средней молекулярной массы методом селективной преципитации полиэтиленгликолем. Реакцию бласттрансформации лимфоцитов ставили с помощью микрометода в круглодонных планшетах. В качестве митогена использовали фитогемагглютинин в концентрации 30 мкг/мл. Пролиферативную активность клеток оценивали по включению H^3 -тимидина с подсчетом на сцинтилляционном счетчике. Рассчитывали индекс бласттрансформации как отношение индуцированной (с митогеном) к спонтанной бласттрансформации. Количественные данные обрабатывали статистически с расчетом среднего значения и ошибки среднего; достоверность различий оценивали с помощью коэффициента Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Циклофосфамид, как алкилирующий агент, подавляет как клеточный, так и гуморальный иммунитет. Цитостатический эффект циклофосфамида на быстропролиферирующую лимфоидную ткань проявился в снижении способности лимфоцитов к реакции бласттрансформации. После 30-дневного воздействия диоксида азота индекс бласттрансформации лимфоцитов снижался в сыворотке крови до $2,05 \pm 0,16$ усл. ед. (в интактной группе $14,4 \pm 1,4$, $p < 0,05$; в контрольной – $12,5 \pm 2,1$, $p < 0,05$) и в бронхоальвеолярной лаважной жидкости до $3,08 \pm 0,16$ усл. ед. (в интактной группе $5,4 \pm 0,2$, $p < 0,05$; в контрольной – $2,88 \pm 0,21$, $p < 0,05$).

Содержание в сыворотке крови циркулирующих иммунных комплексов большой молекулярной массы не претерпевало достоверных изменений ни в одной из групп, в то время как концентрация иммунных комплексов средней молекулярной массы, напротив, нарастала по мере увеличения общей продолжительности ингаляций диоксидом азота (табл. 1). При этом в условиях иммуносупрессии содержание иммунных комплексов средней молекулярной массы в крови нарастало значительно быстрее, чем в группе с нормальной иммунной реактивностью: после 15-дневной экспозиции их содержание превышало интактный уровень на 204 %, а после 30-дневной – на 123 % и было достоверно выше, чем у животных контрольной группы (табл. 1). В бронхоальвеолярной лаважной жидкости, полученной у крыс всех исследованных групп, не было отмечено

значимого присутствия иммунных комплексов. Исключение составили животные с иммунодепрессией, в лаважной жидкости которых после месячного воздействия диоксида азота определялись иммунные комплексы как большой, так и средней молекулярной массы (табл. 1), что свидетельствовало о повреждении бронхоальвеолярного эпителия и увеличении его проницаемости.

Таблица 1.

Содержание иммунных комплексов в сыворотке крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости крыс после ингаляций диоксида азота (в контроле и на фоне иммуносупрессии)

Группы животных	Содержание иммунных комплексов, усл. ед. ($M \pm m$)			
	Сыворотка крови		БАЛЖ	
	ИК большой мол. массы	ИК средней мол. массы	ИК большой мол. массы	ИК средней мол. массы
Интактные	$37,2 \pm 4,2$	$88,2 \pm 8,5$	< 10	< 10
15 дней NO_2 (контроль)	$40,2 \pm 4,9$	$119,1 \pm 8,9$	< 10	< 10
15 дней $\text{NO}_2 + \text{ЦФ}$	$28,2 \pm 6,8$	$268,1 \pm 14,1^{*}\#$	< 10	< 10
30 дней NO_2 (контроль)	$46,6 \pm 4,0$	$128,1 \pm 9,1^{*}$	< 10	< 10
30 дней $\text{NO}_2 + \text{ЦФ}$	$43,4 \pm 4,4$	$196,3 \pm 12,8^{*}\#$	$26,2 \pm 1,7^{*}\#$	$27,4 \pm 2,7^{*}\#$

Примечание: ЦФ – циклофосфамид; БАЛЖ – бронхоальвеолярная лаважная жидкость; ИК – иммунные комплексы; * - различие с интактной группой достоверно, $p < 0,05$; # - различие с контролем достоверно, $p < 0,05$.

Клеточный состав лаважной жидкости уже после 15-дневной экспозиции диоксидом азота претерпевал существенные качественные изменения: в обеих группах снижалось содержание макрофагов и возрастало содержание нейтрофилов и лимфоцитов (табл. 2). Через месяц состав клеточной популяции бронхоальвеолярного пространства практически не изменялся, за исключением пула нейтрофилов: если в контрольной группе их содержание возвращалось к норме, то в группе с иммуносупрессией оно оставалось увеличенным в четыре раза по сравнению с контролем (табл. 2). Ингаляции диоксида азота при всех сроках наблюдения практически не отражались на поглотительной способности альвеолярных макрофагов контрольных крыс, но при этом достоверно возрастала фагоцитарная активность нейтрофилов крови (табл. 3): фагоцитарное число – примерно в 1,5 раза, фагоцитарный индекс – в 3 раза по сравнению с группой интактных

животных. Поглотительная способность альвеолярных макрофагов крыс с иммуносупрессией после 15 дней воздействия диоксида азота почти в два раза превышала аналогичные показатели для контроля и интактных животных, но к 30 дню возвращалась к нормальным значениям. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов на всех сроках наблюдения превышали величины характерные для интактной и контрольной групп животных: после 15 дней фагоцитарное число – в 2,6 и 1,8 раза, фагоцитарный индекс – в 8,3 и 2,7 раза соответственно. После 30-дневной экспозиции число активно фагоцитирующих нейтрофилов несколько снижалось, но оставалось выше, чем в норме (в 1,6 раза), но при этом фагоцитарный индекс превышал значение как у интактных (в 7,1 раза), так и у контрольных крыс (в 2,7 раза).

Таблица 2.

Клеточный состав бронхоальвеолярной лаважной жидкости крыс после ингаляций диоксида азота (в контроле и на фоне иммуносупрессии) ($M \pm m$)

Группы животных	Число клеток в 1 мл БАЛЖ ($\times 10^6$)	Макрофаги, %	Нейтрофилы, %	Лимфоциты, %
Интактные	$10,4 \pm 1,7$	$90,8 \pm 2,8$	$2,9 \pm 0,7$	$6,3 \pm 2,5$
15 дней NO_2 (контроль)	$9,6 \pm 1,1$	$58,1 \pm 6,3^*$	$22,3 \pm 1,7^*$	$19,6 \pm 1,3^*$
15 дней $NO_2 + ЦФ$	$9,4 \pm 1,2$	$69,2 \pm 5,1^*$	$10,4 \pm 1,2^{* \#}$	$20,4 \pm 3,6^*$
30 дней NO_2 (контроль)	$8,9 \pm 0,8$	$75,0 \pm 3,2^*$	$2,0 \pm 0,9$	$23,0 \pm 1,2^*$
30 дней $NO_2 + ЦФ$	$8,8 \pm 0,7$	$78,2 \pm 1,5^*$	$8,0 \pm 0,8^{* \#}$	$13,8 \pm 1,8^{* \#}$

Примечание: ЦФ – циклофосфамид; * - различие с интактной группой достоверно, $p < 0,05$; # - различие с контролем достоверно, $p < 0,05$.

Таблица 3.

Поглотительная активность клеток-фагоцитов у крыс после ингаляций диоксида азота (в контроле и на фоне иммуносупрессии) ($M \pm m$)

Группы животных	Фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов		Фагоцитарная активность нейтрофилов	
	ФЧ, %	ФИ, ед.	ФЧ, %	ФИ, ед.
Интактные	$22,4 \pm 4,8$	$1,64 \pm 0,47$	$31,0 \pm 3,6$	$1,13 \pm 0,06$
15 дней NO_2 (контроль)	$26,4 \pm 5,2$	$2,65 \pm 0,62$	$45,1 \pm 4,3^*$	$3,51 \pm 0,09^*$
15 дней $NO_2 + ЦФ$	$51,6 \pm 6,8^{* \#}$	$4,85 \pm 1,03^*$	$80,0 \pm 8,1^{* \#}$	$9,35 \pm 1,92^{* \#}$
30 дней NO_2 (контроль)	$29,2 \pm 3,2$	$2,73 \pm 0,61$	$42,3 \pm 4,1^*$	$3,02 \pm 0,07^*$
30 дней $NO_2 + ЦФ$	$23,2 \pm 3,9$	$1,90 \pm 0,40$	$50,1 \pm 6,7^*$	$8,05 \pm 1,83^{* \#}$

Примечание: ЦФ – циклофосфамид; * - различие с интактной группой достоверно, $p < 0,05$; # - различие с контролем достоверно, $p < 0,05$.

Высокая концентрация иммунных комплексов средней молекулярной массы в крови животных с иммуносупрессией могла быть обусловлена угнетающим эффектом циклофосфамида на продукцию антител. Известно, что при недостаточности синтеза антител в организме формируются иммунные комплексы среднего размера, обладающие высокой патогенностью, длительно циркулирующие в сосудистом русле и способные инициировать в тканях цепь последовательных патологических процессов [8, 9]. Они могут взаимодействовать с лимфоцитами и нейтрофилами, изменяя их функциональное состояние, блокировать Fc-рецепторы В-лимфоцитов, что приводит к снижению продукции антител и еще большему увеличению отношения антиген/антитело [8]. Сохранению на протяжении месяца высокой концентрации иммунных комплексов в крови способствует определенная функциональная подавленность мноцитарной фагоцитарной системы, осуществляющей клиренс иммунных комплексов. Поглощение иммунных комплексов нейтрофилами периферической крови сопровождается усилением их адгезивной способности, в результате они легче прилипают к эндотелию сосудов, поддерживая локальный воспалительный процесс. Субэндотелиальное отложение иммунных комплексов сопровождается рекрутированием и активацией нейтрофилов и резидентных макрофагов, а продуцируемые ими кислородные радикалы и протеазы вызывают вторичное повреждение ткани легких [10]. Предполагают, что индуцированное отложением иммунных комплексов повреждение легких регулируется белком Rac2 из семейства низкомолекулярных Rho ГТФаз, который отвечает за дегрануляцию, хемотаксис нейтрофилов и продукцию ими супероксидного аниона [11]. Белок Rac2, который в нейтрофилах составляет более чем 96 % всех изоформ Rac, играет важную роль в активации полимеризации актина, что существенно снижает способность нейтрофилов к изменению формы и, как следствие, скорость преодоления ими легочных капилляров [12, 13]. Задерживающиеся в капиллярах нейтрофилы выделяют ряд субстанций, обладающих мощным деструктивным потенциалом, происходит разрушение структурных элементов легких и формирование эмфиземы.

Структурные изменения, происходящие в легочной ткани крыс после 30-дневной экспозиции диоксидом азота, характеризовались дедифференцировкой и атрофией трахеобронхиального эпителия с утратой ресничек, очаговой гиперплазией бокаловидных клеток, наиболее выраженной в области разветвления бронхов, и десквамацией эпителия с

обнажением базальных отделов. В респираторных отделах встречались скопления макрофагов, отмечались отек и лейкоцитарная инфильтрация соединительной ткани вокруг сосудов и бронхов. У животных с иммуносупрессией, помимо описанных выше изменений, отмечались умеренно выраженный перибронхиальный и периваскулярный склероз, очаговый склероз стенок бронхов, расширение интерстициальных прослоек вокруг сосудов и бронхов, лимфогистиоцитарная инфильтрация альвеолярных перегородок, встречались очаги фиброза. Реснитчатый эпителий замещался одно-двухрядным кубическим эпителием. В эпителии крупных бронхов определялись участки плоскоклеточной метаплазии и атрофии бронхиальных желез. Бронхиолы и альвеолярные ходы имели очаги расширения. В респираторной части легких выявлялись признаки эмфиземы.

Заключение. Угнетение иммунологической реактивности организма животных с помощью иммуносупрессора циклофосфида модифицировало картину пневмотоксического эффекта длительного воздействия диоксида азота. Усиливался приток в очаг воспаления нейтрофилов, отличающихся повышенной поглотительной способностью и высоким деструктивным потенциалом. Отмечалось стойкое увеличение содержания в крови высоко патогенных иммунных комплексов средней молекулярной массы. Обнаружение иммунных комплексов в бронхоальвеолярном пространстве свидетельствовало о значительном повреждении эпителиальной выстилки бронхов и альвеол. На фоне иммуносупрессии воспалительные изменения в легких под влиянием диоксида азота формировались значительно быстрее, чем у животных контрольной группы с нормальной иммунной реактивностью, и уже через месяц отмечались характерные признаки ремоделирования легочной ткани с признаками эмфиземы, склероза и фиброзирования.

Литература

1. Kelly F.J., Fussell J.C. Air pollution and airway disease. // Clin. Exp. Allergy. – 2011. – Vol. 41, № 8. – P. 1059-1071.
2. Овчаренко С.И. Факторы, влияющие на развитие обострений хронической обструктивной болезни легких. // Фарматека. – 2010. – № 4 (198). – С. 17-19.
3. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, NHLBI/WHO workshop report – National Heart Lung and Blood Institute, update 2010 / www.goldcopd.com.
4. Безуглая Э.Ю., Смирнова И.В. Воздух городов и его изменения. // sir35.ru/vozdux-gorodov-i-ego-izmenenija. - 2011.

5. 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.
6. Nemery B. Respiratory diseases caused by acute inhalation of gases, vapours and dusts // *ERS handbook. Respiratory medicine.* / Ed. P. Palange, A. Simonds. – Lausanne: European Respiratory Society, 2010. – P. 273-277.
7. Лебедева Е.С., Кузубова Н.А., Данилов Л.Н. и др. Воспроизведение в эксперименте хронической обструктивной болезни легких. // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* – 2011. – Т. 152, № 11. – С. 596-601.
8. Иммунокоррекция в пульмонологии. / Под ред. А.Г. Чучалина. – М.: Медицина, 1989. – 256 с.
9. Miaillhes P., Trepo C. L'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C. // *Med. et. Malad. Infec.* – 2000. – Vol. 30, suppl. 1. – P. 8-13.
10. Ward P.A. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2010. – № 1203. – P. 53-59.
11. Dooley J.L., Abdel-Latif D., St. Laurent C.D. et al. Regulation of inflammation by Rac2 in immune complex-mediated acute lung injury. // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2009. – Vol. 297, № 6. – P. L1091-L1102.
12. Roberts A.W., Kim C., Zhen L. et al. Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defence. // *Immunity.* – 1999. – Vol. 10, № 2. – P. 183-196.
13. Bustelo X.R., Sauzeau V., Berenjeno I.M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. // *Bioessays.* – 2007. – Vol. 29, № 4. – P. 356-370.