

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФОСГЕНА С УЧЕТОМ ОСОБЕННОСТЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ ТКАНЕВЫХ БАРЬЕРОВ

Толкач П.Г.¹, Башарин В.А.¹, Чепур С.В.², Венгерович Н.Г.², Юдин М.А.², Сизова Д.Т.¹

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ

194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

²Государственный научно-исследовательский испытательный институт

военной медицины МО РФ,

195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4

Резюме. Клеточную мишень фосгена уточняли с использованием моделей тканевых барьеров. Аппликацию фосгена крысам осуществляли ингаляционно (LC₅₀ – 3000 ppm/мин) и внутрибрюшинно (3000 ppm). Для положительного контроля внутрибрюшинно вводили хлороводород (10000 ppm). Материал лёгких, печени и брыжейки тонкой кишки для гистологического исследования забирали через 60 мин после отравления. Образцы тканей фиксировали 10 % раствором нейтрального формалина и готовили гистологические препараты по стандартной методике. Ингаляция фосгена вызывала отёк лёгких с воспалительной реакцией, тогда как при его внутрибрюшинном введении воспаления тканей не обнаружено. Хлороводород вызывал некроз мезотелиоцитов и адипоцитов с умеренной лейкоцитарной инфильтрацией в брыжейке тонкой кишки. Сформировано предположение, что в качестве клеточной мишени фосгена, повреждение которой приводит к развитию отёка лёгких, выступают альвеолоциты.

Ключевые слова: пульмонотоксичность, фосген, мезотелиоциты, эндотелиоциты, альвеолоциты, воспаление

INVESTIGATION OF PHOSGENE EXPOSURE MECHANISM BASE ON THE CIRCUMSTANCES OF TISSUE BARRIER ORGANISATION

Tolkach P.G., Basharin V.A., Chepur S.V., Vengerovich N.G., Judin M.A., Sizova D.T.

¹Kirov's Medico-military academy of the Russian Federation Defense Ministry

²State scientific-research test institute of the military medicine of the

Russian Federation Defense Ministry

Abstract. The phosgene cell target was investigated by means of tissue barriers models. Rats were undergo phosgene exposure both of inhalation and intraperitoneal. Group of positive control was consisted of rats with hydrogen chloride intraperitoneal introduction (10000 ppm). Samples of lungs, liver and mesentery were taken after 60 minutes of exposure for

histological investigation. Tissue samples were fixed with 10% neutral formalin solution and histological specimens Inhalation of phosgene caused pulmonary edema with an inflammatory reaction, whereas with its intraperitoneal injection, no tissue inflammation was detected. Hydrogen chloride caused necrosis of mesotheliocytes and adipocytes with moderate leukocyte infiltration in the mesentery of the small intestine. It has been suggested that alveolocytes act as the cellular target of phosgene, the damage of which leads to the development of pulmonary edema.

Key words: pulmonotoxicity, phosgene, mesotheliocytes, endotheliocytes, alveolocytes, infloamation.

Введение.

Фосген (дихлорангидрид угольной кислоты, COCl_2) – одно из первых боевых веществ удушающего действия, использованное немецкими войсками в ходе Первой мировой войны. Несмотря на достаточную продолжительность изучения удушающих ядов, эффективные средства медицинской защиты и предупреждения формирования угрожающих жизни проявлений интоксикации до настоящего времени остаются малоэффективными. Во многом это сопряжено с отсутствием четких представлений о механизмах действия отравляющих веществ этой группы, неопределенностью клеточных и метаболических механизмов реализации токсических эффектов. Фосген широко применяется в современной промышленности, как исходный компонент синтеза различных полимерных соединений (поликарбонатов, полиуретанов, изоцианатов и др.). Общемировое использование фосгена составляет около 15 млн тонн в год, а следовательно угроза поражения им при чрезвычайных ситуациях техногенного характера сохраняется [11].

Фосген оказывает ацилирующее действие и вступает в реакции нуклеофильного присоединения и замещения с макромолекулами, содержащими $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ и $-\text{OH}$ группы, в результате чего происходят изменение структуры и функции макромолекул, что в конечном итоге приводит к необратимым изменениям в клетках [6, 7]. Такие обобщенные представления не могут быть сопоставлены с клеточными мишенями яда, определение которых, имеет принципиальное значение для разработки средств профилактики поражения лёгких.

Фосген поступает в организм исключительно ингаляционным путём и взаимодействует с компонентами аэрогематического барьера (АГБ). Глубина диффузии фосгена составляет около 8 мкм, что не менее чем в 4 раза превышает толщину АГБ [7],

таким образом, фосген может оказывать первичное поражающее действие на все его компоненты.

Zhang X. et al., (2008) показал, что ингаляционное воздействие фосгена на животных вызывает повреждение эндотелиоцитов с высвобождением эндотелина-1, изменения в системе VEGF (фактор роста сосудов) и запуском патологических каскадов, приводящих к токсическому отёку лёгких у лабораторных животных [14]. Снижение содержания цАМФ в эндотелиоцитах, обуславливает вазоконстрикцию и нарушение целостности плотных межклеточных контактов, что приводит к увеличению давления в малом круге кровообращения, нарушению барьерной функции и, как следствие, плазматическому пропитыванию соединительной ткани перегородок и выходу трансудата в альвеолы [12].

Другие авторы указывают на то, что первичное действие фосгена реализуется при поражении альвеолоцитов. В исследовании Filipezak P.T. et al. (2015) эти клетки признаны источником высвобождения свободных радикалов азота в лёгких после воздействия фосгена вследствие активации индуцибельной синтазы оксида азота [4]. Конъюгация оксида азота с супероксидным радикалом образует пероксинитрил, дисмутация которого в кислой среде приводит к образованию высокореактивного гидроксильного радикала [1]. Он опосредует нарушение целостности плотных запирающих контактов между альвеолоцитами, что приводит к дисфункции АГБ и развитию отёка лёгких [4]. Grainge C., (2010) также показал, что фосген воздействует на альвеолоциты – это приводит к воспалительной реакции и увеличению проницаемости АГБ [6]. Вместе с тем, популяция альвеолоцитов гетероморфна и содержит клетки как минимум трех типов, различающихся по источникам происхождения и функциональной активности. Описано взаимодействие фосгена с компонентами сурфактанта, в результате которого из фосфатидилхолинов и сфингомиелина могут образовываться лейкотриеноподобные субстанции, оказывающие провоспалительное действие [2].

Тем не менее, большинство авторов не дифференцируют первичную точку приложения фосгена и указывают на то, что он оказывает поражающее действие на все элементы АГБ [7, 8].

Для поиска первичной мишени действия фосгена (эндотелиоцит или альвеолоцит) в эксперименте можно использовать другие селективные тканевые барьеры, например, серозно-гематический барьер, представленный висцеральной брюшиной.

Поверхность брюшины выстлана одним слоем мезотелиоцитов, закреплённых на базальной мембране, которая лежит на слое коллагеновых и эластичных волокон,

содержащих кровеносные и лимфатические сосуды, а также нервные окончания. Брюшина составляет селективный барьер для жидкости и клеток, перемещающихся между кровотоком и полостью брюшины, представленный стенкой капилляра, соединительной тканью и мезотелиоцитами. Небольшие молекулы (менее 4 нм) могут свободно проникать как через плазмолемму мезотелиоцитов посредством простой диффузии, так и через межклеточные контакты между ними [9]. Вследствие этого, проницаемость брюшины, в первую очередь, ограничена свойствами капиллярного эндотелия [10].

Если предположить, что первичной мишенью фосгена в АГБ является эндотелиоцит, то внутрибрюшинное введение фосгена будет способствовать развитию неинфекционного воспалительного процесса в полости брюшины.

Проверка сформированных гипотез стала **целью** исследования.

Материалы и методы исследования.

В эксперименте использовали белых беспородных крыс-самцов, массой 200-220 г. При проведении экспериментов выполняли требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним. Сформированы четыре репрезентативных группы особей: внутрибрюшинное введение атмосферного воздуха (негативный контроль), внутрибрюшинное введение хлороводорода (позитивный контроль), ингаляционное введение фосгена, внутрибрюшинное введение фосгена. Фосген получали ex tempore и проводили его аппликацию животным в герметичной камере объёмом 0,1 м³ в течение 30 мин, концентрация фосгена составляла 100 ppm (LC₅₀=3000 ppm/мин). Внутрибрюшинно газовоздушную смесь, содержащую фосген в концентрации 3000 ppm, вводили шприцом в объёме 5 мл. Аналогично вводили газовоздушную смесь, содержащую хлороводород в концентрации 10000 ppm. Концентрацию фосгена и хлороводорода в газовоздушной смеси определяли газоанализатором Porta Sens II (ATI, США).

Животных выводили из эксперимента через 60 мин после воздействия, передозировкой раствора золетила (Valdefar, Франция). Для гистологического исследования при аутопсии отбирали участки тонкой кишки с брыжейкой, печень и лёгкие. Полученные материалы фиксировали 10 % раствором нейтрального формалина, гистологические препараты готовили по стандартной методике и окрашивали гематоксилином и эозином. Микропрепараты исследовали на светооптическом микроскопе МИКМЕД-6 («Аналит-Нева», Россия) и выполняли фоторегистрацию.

Результаты исследования.

На брыжейки тонкой кишки животных группы негативного контроля изменений после внутрибрюшинного введения атмосферного воздуха не выявлено. Полигональные клетки однослойного мезотелия без дефектов располагались над подлежащими фенестрированными капиллярами, частично заполненными эритроцитами (рис. 1). В группе позитивного контроля непосредственно в месте введения хлороводорода определяли покрытую фибрином зону повреждения висцеральной брюшины в виде беловатых сливающихся очагов коагуляционного некроза с чёткой границей зоны повреждения (рис. 2). При микроскопическом исследовании брыжейки тонкой кишки выявляли зоны множественного коагуляционного некроза мезотелиоцитов со слущиванием гиперхромных пикнотизированных клеток. Некротические изменения часто затрагивали адипоциты, а структуры соединительной ткани подвергались набуханию и дезорганизации, с плазматическим пропитыванием и умеренной неравномерно выраженной лейкоцитарной инфильтрацией (рис. 3).

Ингаляционное воздействие фосгена в выбранных дозах приводило к формированию токсического отёка лёгких уже через 60 мин после окончания воздействия (рис. 4). Отмечали выраженную мононуклеарную инфильтрацию перивазального и перибронхиального интерстиция с утолщением межалвеолярных перегородок при полнокровии преимущественно ёмкостных сосудов гемомикроциркуляторного русла. Прослеживали выход лейкоцитов и эритроцитов в альвеолярное пространство, накопление гомогенного эозинофильного альбуминсодержащего транссудата в альвеолах и формирование дисателектазов.

При внутрибрюшинном введении фосгена структура брыжейки тонкой кишки не отличалась от группы негативного контроля. На импрегнированных тотальных препаратах мезотелиоциты с четкими контурами без дефектов покрывали структуры соединительной ткани. Изменений сосудов гемомикроциркуляторного русла и признаков перераспределения крови в сосудах гемомикроциркуляторного русла не выявлено (рис. 5). Важно отметить, что при микроскопическом исследовании лёгких и печени животных, которым фосген был введён внутрибрюшинно, патологических изменений также не выявлено, что определяет сопряженность проявлений ингаляционной интоксикации именно с повреждением альвеолярного эпителия.

Обсуждение результатов.

Ингаляционное воздействие фосгена в выбранной концентрации уже через 60 мин приводило к критическим изменениям паренхимы лёгких. Отмечали воспалительную реакцию, сопровождающуюся экстравазальным пропотеванием жидкости,

плазматическим пропитыванием структур соединительной ткани и выходом транссудата в альвеолярное пространство. Полученные результаты соответствуют данным о роли активации провоспалительных факторов в фосген-индуцированном токсическом отёке лёгких [4]. Так как фосген проникает через всю толщу АГБ [7], то, предполагается, что он может первично воздействовать на слой сурфактанта, альвеолоциты и на эндотелиоциты.

Для поиска первичной клеточной мишени воздействия фосгена была выбрана модель серозно-гематического барьера, представленного висцеральной брюшиной [9]. С учётом того, что мезотелиоциты свободно проницаемы для молекул, размер которых меньше 4 нм (размер молекулы фосгена около 0,2 нм), а слой коллагеновых и эластичных волокон не ограничивает проникновение веществ [10], можно предположить, что фосген, введённый внутрибрюшинно, в первую очередь будет воздействовать на эндотелиоциты капилляров. Таким образом, если фосген, первично действуя на эндотелиоциты, приводит к запуску провоспалительного каскада, то при внутрибрюшинном введении фосгена возможно развитие типичной воспалительной реакции в брюшине.

Для положительного контроля животным в полость брюшины вводили хлороводород. Будучи водорастворимым газом хлороводород, взаимодействует с водой и превращается в соляную и хлорноватистую кислоты. Это способствует резкому изменению рН среды, денатурации макромолекул с формированием коагуляционного некроза [13], активации воспалительного процесса для отграничения области некроза и лизиса поражённых клеток [1]. Прослеженная ограниченность процесса отражает высокую скорость формирования местных изменений при введении хлороводорода.

Введение фосгена в брюшинную полость не вызывало изменений структуры брыжейки тонкой кишки. Несмотря на то, что фосген быстро гидролизует в воде до соляной кислоты и углекислого газа (период полураспада составляет 0,026 с [5]), даже этого времени задержки хватило для активации защитных буферных механизмов. При микроскопическом исследовании после внутрибрюшинного введения фосгена признаков воспалительной реакции и некроза, свойственных введению хлороводорода в составе газовой смеси не отмечено. При микроскопическом исследовании лёгких и печени группы животных, получавших фосген внутрибрюшинно, патологических изменений в этих органах не отмечали, что также исключает вероятность участия эндотелия и его метаболических систем в качестве первичных клеточных эффекторов фосгена.

Основное отличие между серозно-гематическим и аэрогематическим барьерами заключается в элементах, обращённых к брюшинному и альвеолярному пространствам. В первую очередь, это слой сурфактанта, который отсутствует в серозно-гематическом

барьер. Помимо этого альвеолоциты, в особенности I типа, в отличие от мезотелиоцитов экспрессируют различные провоспалительные маркеры (IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, IL-18, TNF α) [9]. Сравнительная характеристика мезотелиоцитов и альвеолоцитов I типа приведена в таблице 1. Можно предположить, что воспалительная реакция, развивающаяся в тканях лёгких, приводящая к токсическому отёку лёгких, при ингаляционном поступлении фосгена может быть связана с выбросом провоспалительных медиаторов альвеолоцитами либо в ответ на прямое действие фосгена, либо на продукты его взаимодействия с сурфактантом, что требует отдельного изучения.

Таблица 1. Сравнительная характеристика мезотелиоцитов и альвеолоцитов I типа [9].

Параметр	Мезотелиоцит	Альвеолоцит I типа
Происхождение	Спланхнотомы	Энтодерма
Структура клетки	Клетки плоские, с прозрачной цитоплазмой и маленьким центральным расположенным ядром с гомогенным хроматином, на апикальной поверхности множество микроворсинок длиной до 3 мкм. Между клетками сформированы поры.	Клетки плоские, с множеством пузырьков и везикул в цитоплазме, на поверхности, покрытой сурфактантом, расположены цитоплазматические выросты (0,2-0,4 мкм). Между клетками сформированы плотные запирающие контакты.
Экспрессируемые вещества	Предпочтительно экспрессируют: а) мезотелиальные маркеры: калретинин; цитокератин; тромбомодулин и др. б) мезотелеин; в) эпителиальный мембранный антиген; г) N-кадгерин и др.	Предпочтительно экспрессируют: а) эпителиальный мембранный антиген; б) цитокератин; в) кавеолин; г) аквапорин; д) провоспалительные медиаторы: IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, IL-18, TNF α ; е) цитокератин-20 и др.

Заключение.

Результаты проведённого экспериментального исследования расширяют представления о механизмах пульмонотоксического действия фосгена. Пример

использования тканевой модели *in vivo* в настоящем исследовании позволил определить альвеолоциты как первичную клеточную мишень при отравлении фосгеном, что наряду с описанием общебиологических реакций позволит обосновать новые подходы к патогенетической терапии поражений веществами удушающего действия.

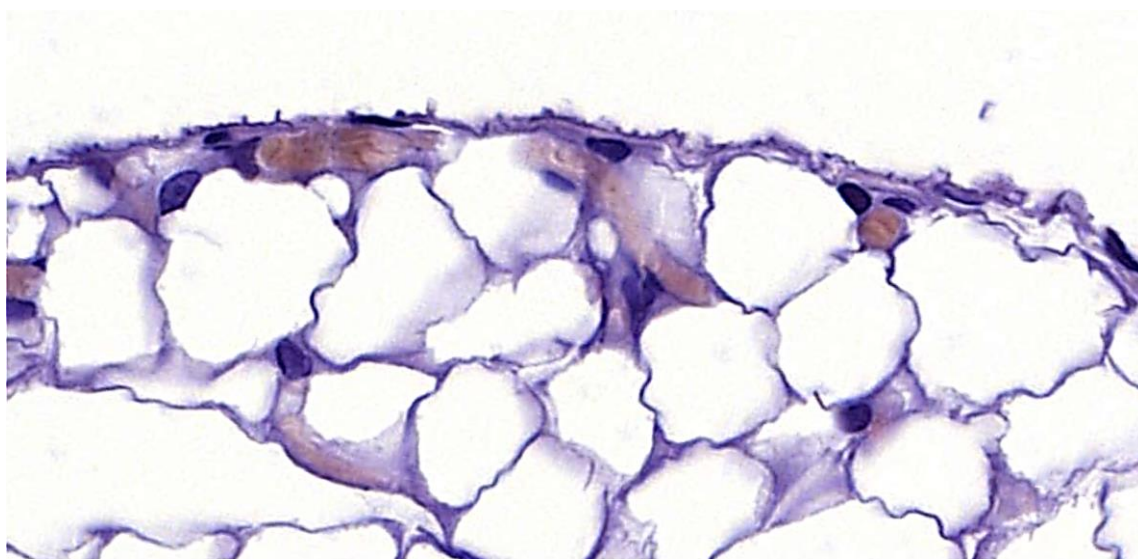


Рисунок 1 – Участок висцеральной брюшины крыс с уплощенными полигональными мезотелиоцитами, адипоцитами и капиллярами в группе негативного контроля. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 400$.

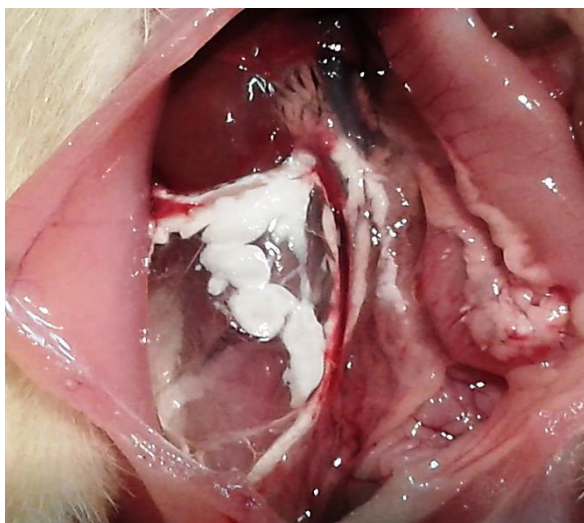


Рисунок 2 – Участки коагуляционного некроза брюшины в месте введения хлороводорода крысам из группы позитивного контроля. Макросъемка.

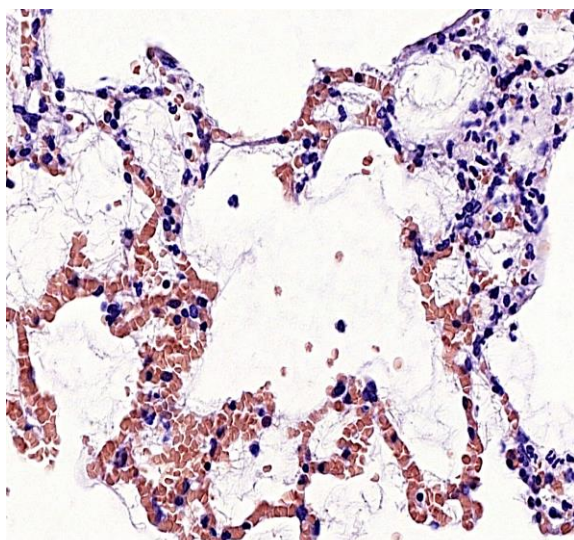


Рисунок 4 – Ацинус паренхимы легкого с белковым выпотом, в составе которого определяются эритроциты и полиморфноядерные лейкоциты, на фоне полнокровия сосудов локально утолщенных межалвеолярных перегородок при формировании токсического отёка лёгкого через 1 час после ингаляционного отравления фосгеном. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400.

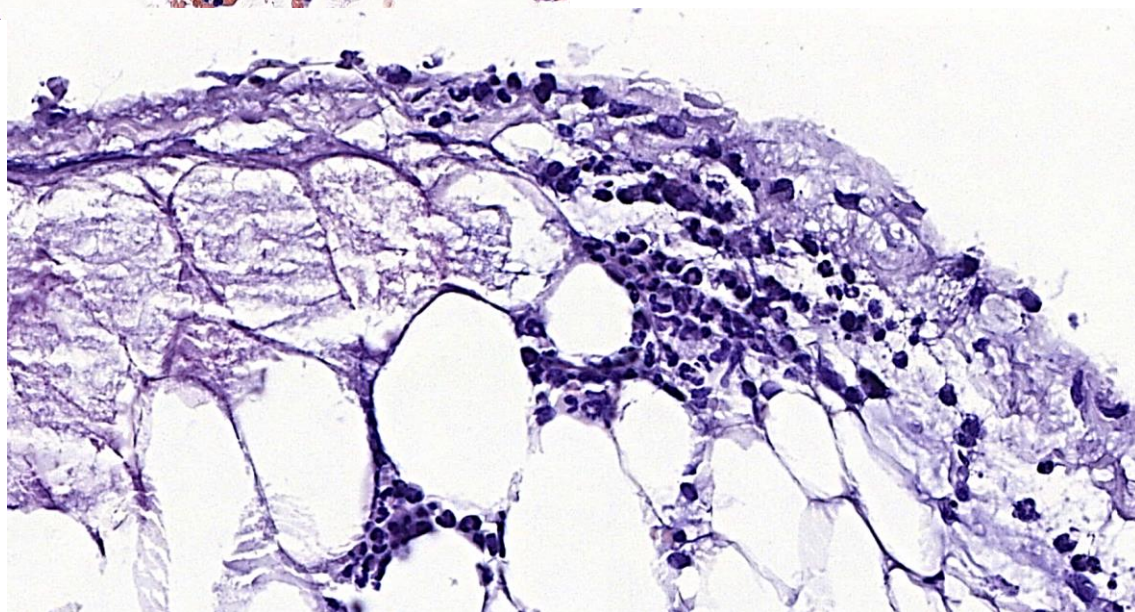


Рисунок 3 – Пикноз мезотелиоцитов и слущивание погибших клеток с оголением утолщенной базальной мембраны, плазматическое пропитывание и лейкоцитарная инфильтрация соединительнотканной стромы и дистрофические изменения адипоцитов через 1 час после введения хлороводорода в составе газовой смеси. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400.

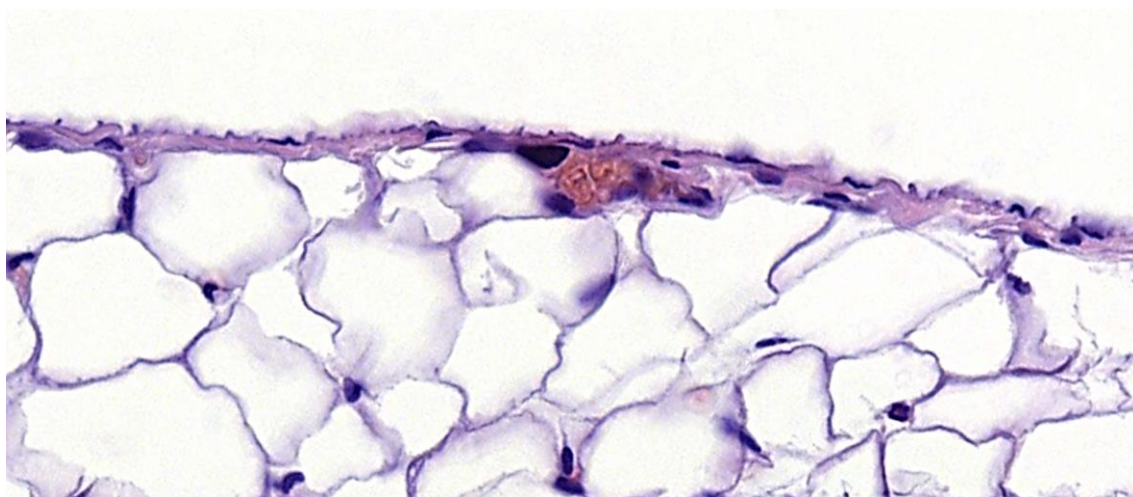


Рисунок 5 - Участок висцеральной брюшины с истонченными полигональными мезотелиоцитами, адипоцитами и неизмененными капиллярами через 1 час после внутрибрюшинного введения фосгена. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400.

Литература

1. Оксидативный стресс и воспаление: патогенетическое партнерство: монография / Под ред. О.Г. Хурцилавы, Н.Н. Плужникова, Я.А. Накатиса. – СПб. Изд-во СЗГМУ им. И.И.Мечникова, 2012. 340 с.
2. Chen H., Hai C., Liang X., Zhang X., [et al] Correlation between sPLA2-IIA and phosgene-induced rat acute lung injury // Inhal. Toxicol. 2009;21:374-80. <https://doi.org/10.1080/08958370802449712>
3. Duniho S.M., Martin J., Forster J.S., Cascio M.B., [et al] Acute changes in lung histopathology and bronchoalveolar lavage parameters in mice exposed to the choking agent gas phosgene // Toxicol. Pathology. 2002;30(3):339-49. <https://doi.org/10.1080/01926230252929918>
4. Filipczak P.T., Senft A.P., Seagrave J.C., Weber W., [et al] NOS-2 inhibition in phosgene-induced acute lung injury // Toxicol. Scien. 2015;146(1):89-100. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv072>
5. Fosgene. Human health effects. Toxicity summary. Toxnet. Toxicology data network. URL: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cda-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+796> (дата обращения: 19.11.2018).
6. Grainge C., Rice P. Management of phosgene-induced acute lung injury // Clin. Toxicol. 2010;48:497-508. <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.506877>
7. Holmes W.W., Keyser B.M., Paradiso D.C., Ray R., [et al] Conceptual approaches for treatment of phosgene inhalation-induced lung injury // Toxicol. Lett. 2016;244:8-20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.010>

8. Lange D.W., Meulenbelt J. Do corticosteroids have a role in preventing or reducing acute toxic lung injury caused by inhalation of chemical agents? // Clin. Toxicol. 2011;49:61-71. <https://doi.org/10.3109/15563650.2011.553196>
9. Mills S.E. Histology for pathologists, 3rd ed. - Lippincott Williams & Wilkins, 2007. P. 547-562.
10. Nagel W., Kuschinsky W. Study of the permeability of the isolated dog mesentery // Europ. J. Clin. Invest. 1970;1:149-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1970.tb00610.x>
11. Salem E. Inhalation toxicology. Third ed. - CRC PressTaylor & Francis Group, 2015. P. 459-489.
12. Sciuto A.M., Hurt H.H. Therapeutic treatments of phosgene-induced lung injury // Inhal. Toxicol. 2004; 16:565-80. <https://doi.org/10.1080/08958370490442584>
13. White C.V., Martin J.G. Chlorine gas inhalation: human clinical evidence of toxicity an experience in animal models // Proc. Am. Thorac. Soc. 2010;7(4):257-63. <https://doi.org/10.1513/pats.201001-008sm>
14. Zhang X., Hai C. Time course for expression of VEGF and its receptor and regulator levels of contraction and relaxation in increased vascular permeability of lung induced by phosgene // Inhalation Toxicology. 2008. V. 20. P. 805-812. <https://doi.org/10.1080/08958370802015091>

Reference

1. Oxidative stress and inflammation: pathogenic partnership / Ed. by O.G. Khurtsilava, N.N. Pluzhnikov, J.A. Nakatis. – SPb, NWSMU named after I.I. Mechnikov, 2012. 340 p. [In Russian].
2. Chen H., Hai C., Liang X., Zhang X., [et al] Correlation between sPLA2-IIA and phosgene-induced rat acute lung injury // Inhal. Toxicol. 2009;21:374-80. <https://doi.org/10.1080/08958370802449712>
3. Duniho S.M., Martin J., Forster J.S., Cascio M.B., [et al] Acute changes in lung histopathology and bronchoalveolar lavage parameters in mice exposed to the choking agent gas phosgene // Toxicol. Pathology. 2002;30(3):339-49. <https://doi.org/10.1080/01926230252929918>
4. Filipczak P.T., Senft A.P., Seagrave J.C., Weber W., [et al] NOS-2 inhibition in phosgene-induced acute lung injury // Toxicol. Scien. 2015;146(1):89-100. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv072>

5. Fosgene. Humah health effects. Toxicity summary. Toxnet. Toxicology data neywork. URL: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cda-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+796> (дата обращения: 19.11.2018).
6. Grainge C., Rice P. Management of phosgene-induced acute lung injury // Clin. Toxicol. 2010;48:497-508. <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.506877>
7. Holmes W.W., Keyser B.M., Paradiso D.C., Ray R., [et al] Conceptual approaches for treatment of phosgene inhalation-induced lung injury // Toxicol. Lett. 2016;244:8-20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.010>
8. Lange D.W., Meulenbelt J. Do corticosteroids have a role in preventing or reducing acute toxic lung injury caused by inhalation of chemical agents? // Clin. Toxicol. 2011;49:61-71. <https://doi.org/10.3109/15563650.2011.553196>
9. Mills S.E. Histology for pathologists, 3rd ed. - Lippincott Williams & Wilkins, 2007. P. 547-562.
10. Nagel W., Kuschinsky W. Study of the permeability of the isolated dog mesentery // Europ. J. Clin. Invest. 1970;1:149-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1970.tb00610.x>
11. Salem E. Inhalation toxicology. Third ed. - CRC PressTaylor & Francis Group, 2015. P. 459-489.
12. Sciuto A.M., Hurt H.H. Therapeutic treatments of phosgene-induced lung injury // Inhal. Toxicol. 2004; 16:565-80. <https://doi.org/10.1080/08958370490442584>
13. White C.V., Martin J.G. Chlorine gas inhalation: human clinical evidence of toxicity an experience in animal models // Proc. Am. Thorac. Soc. 2010;7(4):257-63. <https://doi.org/10.1513/pats.201001-008sm>
14. Zhang X., Hai C. Time course for expression of VEGF and its receptor and regulator levels of contraction and relaxation in increased vascular permeability of lung induced by phosgene // Inhalation Toxicology. 2008. V. 20. P. 805-812. <https://doi.org/10.1080/08958370802015091>