

УДК 616.24-092

**СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛЕГКИХ ПРИ АЭРОЗОЛЬНОМ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА, ДИСПЕРГИРОВАННОГО В ГИДРОФОБНОЙ И ВОДНОЙ ФАЗЕ**

**Фролов Д.М., Алексеенко А.Ю., Новочадов В.В.**

*ФГАОУ ВПО «Волгоградский государственный университет», Волгоград, e-mail: biobio@volsu.ru*

В опытах на 29 белых крысах проведено исследование морфологии легких после ингаляции малых доз бактериального липополисахарида, диспергированного в различных фазах – водной и липофильной каждые 48 часов в течение 7 и 14 суток. Используются классические гистологические и количественные морфологические методики. Изменения в легких соответствовали картине субхронического токсического бронхоальвеолита с частичной деструкцией бронхиального эпителия и альвеолоцитов, макрофагальными реакциями и умеренно выраженной бронхиальной экссудацией. Цитотоксические изменения в бронхах и альвеолах были более выражены при использовании в качестве диспергента липидов, реакции макрофагов и экссудация – при ингаляции липополисахарида, диспергированного в водной фазе.

**Ключевые слова:** липополисахарид, ингаляционное поступление, легкие, морфология

**STRUCTURAL CHANGES IN THE LUNG BY AEROSOLIC LIPOPOLYSACCHARIDE, DISPERSED IN THE HYDROPHOBIC AND THE HYDROPHILIC PHASE**

**Frolov D.M., Alekseenko A.Y., Novochadov V.V.**

*Volgograd State University, Volgograd, Russia e-mail: biobio@volsu.ru*

We have carried out the modeling of toxic lung injury by repeated low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhalation due to 7 and 14 days. To show differences between action of LPS suspended in aqueous or lipid phases, two groups (12 rats in each) have used, compared to control (5 rats). The classic histology data, and the estimation of surface epithelial density in bronchial wall and alveoli (1/мм<sup>2</sup>), bronchial exudate volume and air volume (%), volume density of bronchial and alveolar macrophages (1/мм<sup>3</sup>) show the development have evidenced the development of subchronic toxic bronchoalveolitis. It realized in partial damage and desquamation of epithelium, macrophage activation, and the moderate exudation. The inhalation of lipid-immersed LPS induced more severe cytotoxic reaction; however the water-immersed LPS has been more effective to induce the macrophage activation and exudation in bronchi.

**Keywords:** lipopolysaccharide, inhalation, lungs, morphology

За последние десятилетия в биологии и медицине сформировано представление о роли продуктов бактериального происхождения, прежде всего липополисахарида (ЛПС), в патогенезе множества инфекционных и неинфекционных болезней. Достоверно известно, что именно с эффектами аэрогенного ЛПС связана высокая распространенность хронических неспецифических болезней легких и фиброзирующих альвеолитов. В последнее время все чаще в литературе можно встретить информацию о высоком риске развития легочной патологии у людей, имеющих профессиональный контакт с аэрогенной формой бактериального эндотоксина – работников мясокомбинатов, парниковых хозяйств и ряда подобных предприятий [9].

В норме ЛПС, образующийся естественным путем в кишечнике, проникает в лимфу и кровь, где встречается с хорошо сбалансированной системой антиэндотоксиновой защиты [6]. При избыточном поступлении ЛПС функциональный резерв защитных механизмов снижается, его высокие концентрации запускают цитокиновый каскад, лежащий в основе развития сепсиса. В лите-

ратуре хорошо описаны биологические эффекты эндотоксемии при неингаляционном введении ЛПС лабораторным животным [1, 3, 7]; сформулированы три основных механизма развития органопатологии при действии ЛПС (цитотоксичность, сосудисто-макрофагальная реакция, фиброгенез) и их маркерные показатели при морфологическом исследовании [5]. Иным образом реагирует организм на ингаляционное проникновение ЛПС [10, 11]. Представления о системных эффектах хронической ингаляции малых доз бактериальных ЛПС в настоящее время только начинают формироваться.

Сложный химический состав ЛПС (гидрофильные О-специфические полисахаридные цепи и олигосахарид кора в сочетании с гидрофобным липидом А) определяет его амфифильные свойства [12]. В различных растворителях или диспергентах эти свойства могут предопределять особенности токсикокинетики ЛПС и его итоговое воздействие на клеточные и тканевые структуры. Данный вопрос изучен до настоящего времени недостаточно.

**Цель настоящей работы** – выявить биологический эффект на органы лабора-

торных животных аэрогенного мелкодиспергированного бактериального ЛПС, растворенного в гидрофобной (липофильной) и водно-соляном носителе.

### Материалы и методы исследования

Эксперимент проводили на 29 нелинейных белых крысах породы Вистар массой от 220 до 240 г, полученных из нелинейных стоков Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. При проведении работы руководствовались этическими нормами, изложенным в «Международном кодексе медицинской этики» (1994), Хельсинской декларации (2000) и Директивах Европейского сообщества 86/609ЕЕС. Животные содержались в открытой системе, клетки Т-4, стандартная подстилка, при температуре 25–26°C, влажность не контролировалась. Освещение было естественным, со свободным доступом к еде и воде. Животных разделили на три группы. В первой группе животные получали каждые 48 ч аэрозоль ЛПС *Escherichia coli* 01 28: B12 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), диспергированного в 0,9% NaCl (водная дисперсия). Поступление токсина обеспечивали при помощи компрессорного ингалятора CN-231 (Россия) со средним размером частиц 4 мкм, в специальной герметичной камере объемом 100 литров. Условия опыта были подобраны так, что за время нахождения в камере каждое животное инспирировало ЛПС в дозе порядка 200 мкг/кг массы. Во второй группе проводили аналогичные ингаляции с той же частотой, но использовали ЛПС, диспергированный в гидрофобной липидной фазе. По шесть животных первой и второй групп выводили из опыта на 7-е и 14-е сутки передозировкой нембутала (100 мг/кг массы). Контрольную группу составили 5 крыс, находящихся в обычных условиях вивария без каких-либо воздействий.

Фрагменты ткани легких размером 0,5×0,5 см фиксировали в нейтральном 10% формалине, обезжировали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. С парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином [2]. Исследование, видеодокументирование микропрепаратов и морфо-

метрия были проведены в соответствии с принципами системного количественного анализа, для этого использовали аппаратно-компьютерный комплекс «Видеотест-Морфо» 3.0 (Россия). Рассчитывали поверхностные плотности эпителиоцитов бронхов и альвеолоцитов (1/мм<sup>2</sup>), объемные доли бронхиального экссудата и воздуха альвеол (мкм<sup>3</sup>/мкм<sup>3</sup>), численную плотность бронхиальных и альвеолярных макрофагов (1/мм<sup>3</sup>).

Математическую обработку данных проводили из общей матрицы данных Excel с привлечением возможности программ Image Tool и Statistica. Определяли показатели средней, её среднеквадратичного отклонения, моды. При оценке достоверности отличий выборки руководствовались закономерностями, принятыми для медико-биологических исследований [4].

### Результаты исследования и их обсуждение

Микроскопическое исследование легочной ткани выявило признаки хронического воспаления. В просвете бронхов были видны слущенные эпителиальные клетки, небольшое количество слизистого экссудата и увеличение количества бронхиальных макрофагов. Часть альвеол была эмфизематозно расширена до разрывов со слиянием соседних альвеол, часть – с уменьшенным просветом за счет увеличения объема межальвеолярных перегородок. При этом ткань перегородок была отечна, полнокровна, вблизи поверхности выявляли скопления альвеолярных макрофагов. Просвет альвеол был чист. Количественные показатели легочного повреждения при ингаляционном поступлении ЛПС, растворенного в водной и гидрофильной фазе, отображены в таблице. Достоверных признаков новообразования соединительной ткани в легких, с учетом продолжительности эксперимента, ни в одном случае не наблюдали.

Показатели морфометрии легочной ткани при ингаляционном поступлении ЛПС, растворенного в водной и гидрофобной фазе (M ± m)

Показатель	Дисперсия ЛПС	Сроки эксперимента		
		Контроль	7 суток	14 суток
Поверхностная плотность эпителиоцитов бронхов, (1/мм <sup>2</sup> )	Водная	9864 ± 429	9727 ± 902	6127 ± 730*
	Липидная		4980 ± 593*#	2927 ± 663 *#
Объемная доля бронхиального экссудата, (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> )	Водная	0,60 ± 0,08	2,64 ± 0,18*	2,49 ± 0,15*
	Липидная		0,55 ± 0,03#	0,72 ± 0,03#
Численная плотность бронхиальных макрофагов, (1/мм <sup>3</sup> )	Водная	474 ± 19,3	769 ± 38,0*	1352 ± 59,1 *
	Липидная		598 ± 27,8*#	940 ± 49,5*#
Объемная доля воздуха альвеол, %	Водная	60,2 ± 2,6	55,1 ± 2,1	41,7 ± 2,6*
	Липидная		47,8 ± 1,7*#	39,2 ± 2,8*#
Поверхностная плотность альвеолоцитов, (1/мм <sup>2</sup> )	Водная	8432 ± 313	8137 ± 1308	5281 ± 346*
	Липидная		5741 ± 1433#	4275 ± 169*#
Численная плотность альвеолярных макрофагов, (1/мм <sup>3</sup> )	Водная	163 ± 9,3	366 ± 15,8*	614 ± 26,1*
	Липидная		211 ± 12,4*#	471 ± 23,5*#

Примечания:

\* – достоверные различия с величиной показателя в контрольной группе (P < 0,05);

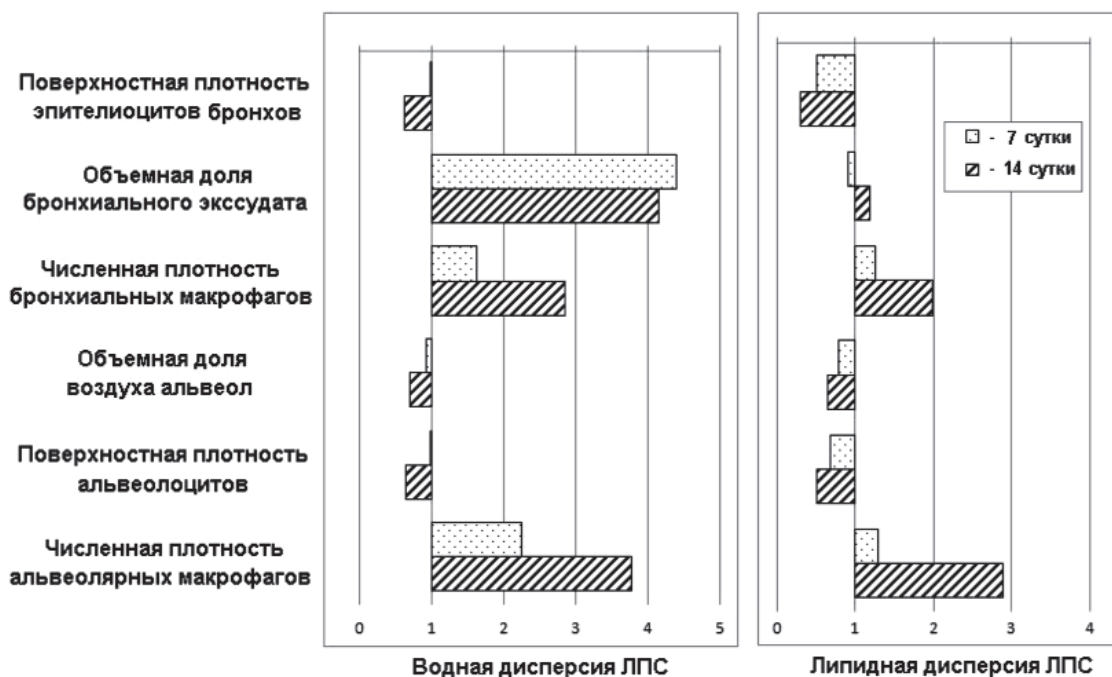
# – различия в зависимости от дисперсии ЛПС.

Поверхностная плотность эпителиоцитов бронхов на 7-е сутки ингаляции ЛПС в водной дисперсии практически не изменялась, а к 14-м суткам была уменьшена в 1,61 раза ( $P < 0,01$ ). При ингаляции ЛПС, диспергированного в липидной фазе, снижение величины показателя было значительнее, фиксировалось к 7-м суткам опыта, а к 14-м суткам было ниже аналогичного у интактных животных в 3,37 раза ( $P < 0,001$ ). ОД бронхиального экссудата при ингаляции ЛПС, диспергированного в водной фазе, было увеличено на 7-е сутки опыта в 4,4 раза, на 14-е сутки – в 4,15 раза (оба  $P < 0,001$ ). В противовес этому, при интоксикации ЛПС в липидной фазе достоверных изменений ОД бронхиального экссудата не обнаруживали. Ингаляции ЛПС в водной фазе сопровождалась увеличением численной плотности бронхиальных макрофагов в 2,85 раза к 14-м суткам ( $P < 0,001$ ), ингаляция ЛПС в липидной фазе – сходным по динамике, но менее выраженным увеличением (повышение в 1,98 раза,  $P < 0,01$ ).

Воздушность легочной ткани (по ОД воздуха альвеол) в серии с ингаляцией ЛПС в водной фазе достоверно снижалась в 1,44 раза только к 14-м суткам ( $P < 0,05$ ), в серии с ингаляцией ЛПС в липидной фазе, начиная с 7-х суток, но к 14-м суткам – в примерно той же степени по абсолютным значениям. Поверхностная плотность альвеолоцитов снижалась в двух

сериях неодинаково: при использовании ЛПС в водной фазе достоверное уменьшение величины показателя зарегистрировано только на 14-е сутки (в 1,60 раза,  $P < 0,05$ ); при использовании ЛПС в липидной фазе – начиная с 7-х суток и почти в 2 раза к 14-м суткам ( $P < 0,01$ ). Численная плотность альвеолярных макрофагов прогрессивно увеличивалась в обеих сериях экспериментов, превышая значения в контрольной группе в серии с ингаляцией ЛПС в водной фазе в 3,77 раза ( $P < 0,001$ ), в серии с ингаляцией ЛПС в липидной фазе – в 2,89 раза ( $P < 0,001$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что повторные ингаляции малых доз ЛПС в различных по физико-химическим свойствам диспергентах сопровождаются развитием легочного повреждения, отдельные механизмы и проявления которого зависят от вида диспергента. При сопоставлении динамики отдельных морфометрических показателей можно видеть, что при ингаляции ЛПС, диспергированного в водной фазе, более ранними и выраженными являются реакции со стороны бронхиальной и альвеолярной популяций легочных макрофагов. При ингаляции ЛПС, диспергированного в липидной фазе, эти реакции наступают позже и менее яркие, тогда как очень выражены цитотоксические проявления, выражающиеся в убыли бронхиального и альвеолярного эпителия (рисунок).



Сравнение изменений морфологических показателей крыс опытных групп при растворении в различной фазе ЛПС (1 – показатель животных контрольной группы)

Экспериментально установлено, что ингаляционное проникновение ЛПС усиливает продукцию сурфактанта альвеолоцитами. Считается, что помимо механических свойств липидные компоненты этого альвеолярного секрета могут модулировать воспалительные реакции в легких [8]. Вероятным механизмом наблюдаемых различий, таким образом, следует считать относительно большую местную задержку ЛПС, диспергированного в липидной фазе, в поверхностной выстилке бронхов и альвеол. Это, с одной стороны, ограничивает проникновение токсина в подлежащие ткани и кровотоки, но, с другой стороны, способствует более тяжелому местному токсическому эффекту.

### Заключение

При повторных ингаляциях малых доз бактериального ЛПС, диспергированного в водной и гидрофобной фазе в течение 7–14 суток, развивается повреждение легочной ткани по типу субхронического бронхоальвеолита, сопровождающееся, с частичной деструкцией бронхиального эпителия и альвеолоцитов, макрофагальными реакциями, снижением воздушности легких и умеренно выраженной бронхиальной экссудацией. При ингаляции ЛПС в липидной фазе в бронхах и альвеолах более выражены цитотоксические изменения эпителия, при ингаляции ЛПС в водной фазе – реакции со стороны макрофагов и экссудативные проявления воспаления.

### Список литературы

1. Тиреоидная модуляция ФНО-зависимого апоптоза и формирование хронической патологии печени при эндогенной интоксикации у крыс / С.А. Калашникова, В.В. Новочадов, А.Н. Горячев, А.И. Шеголев // Бюлл. экспер. биол. и медицины. – 2009. – Т. 147, №2. – С. 201–206.
2. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
3. Косырева А.М., Симонова Е.Ю., Макарова О.В. Половые различия реакции иммунной системы и легких при экспериментальном остром эндотоксикозе // Бюлл. экспер. биол. и медицины. – 2012. – Т. 153, №3. – С. 318–321.
4. Новиков Д.А., Новочадов В.В. Статистические методы в экспериментальной биологии и медицине. – Волгоград, 2005. – 84 с.
5. Писарев В.Б., Богомолова Н.В., Новочадов В.В. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2008. – 320 с.
6. Яковлев М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека // Физиология человека. – 2003. – Т. 29, № 4. – С. 98–109.
7. Beloborodova N. V., Osipov G. A. Small molecules originating from microbes and their role in microbes-host relationship // *Microb. Ecol. Health Dis.* – 2000. – Vol. 12, № 1. – P. 12–21.
8. Abate W., Alghaithy A. A., Parton J., Jones P. K., Jackson K.S. Surfactant lipids regulate LPS-induced interleukin-8 production in A549 lung epithelial cells by inhibiting

translocation of TLR4 into lipid raft domains // *J Lipid Res.* – 2010. – Vol. 51, № 2. – P. 334–344.

9. Brass D. M., Hollingsworth J. W., Cinque M., Li Z., Potts E., Toloza E., Foster M. W., Schwartz D. A. Chronic LPS inhalation causes emphysema-like changes in mouse lung that are associated with apoptosis // *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 39, № 5. – P. 584–590.

10. Liebers V., Raulf-Heimsoth M., Brüning T. Health effects due to endotoxin inhalation (review) // *Arch. Toxicol.* – 2008. – Vol. 82, № 4. – P. 203–210.

11. Möller W., Heimbeck I., Hofer T.P.J., Saba G.K., Neiswirth M., Frankenberger M., Heitbrock L.Z. Differential inflammatory response to inhaled lipopolysaccharide targeted either to the airways or the alveoli in man // *PLOS One.* – 2012. – Vol. 7, № 4. – e33505.

12. Wei S.D., Li J.Z., Liu Z.J., Chen Q., Chen Y., Chen M., Gong J.P. Dexamethasone attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by down-regulating glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand in Kupffer cells // *Hepatology Res.* – 2011. – Vol. 41. – № 10. – P. 989–999.

### References

1. Kalashnikova S.A., Goryachev A.N., Novochadov V.V., Shchyogolev A.I. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. Vol. 147, no. 2, pp. 240–244.
2. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. *Osnovy gistologicheskoy tehniki* [The basis of histological techniques]. SPb., Speclit, 2010, 95 p.
3. Kosyрева A.M., Simonova E.Y., Makarova O.V. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. Vol. 153, no 3, pp. 340–342.
4. Novikov D.A., Novochadov V.V. *Statisticheskie metody v eksperimentalnoj biologii i medicine* [Statistical Methods in Experimental Biology and Medicine]. Volgograd, VolSMU, 2005, 84 p.
5. Pisarev V.B., Bogomolova N.V., Novochadov V.V. *Bakterial'nyj endotoksikoz: vzglyad patologa* [Bacterial endotoxicosis: a pathologist view]. Volgograd, VolSMU, 2008, 320 p.
6. Yakovlev M.Y. *Fiziologija cheloveka* [Human Physiology]. 2003, no. 4, pp. 98–109.
7. Beloborodova N.V., Osipov G.A. *Microbial Ecol. Health Disease.* 2000, no 1, pp. 12–21.
8. Abate W., Alghaithy A.A., Parton J., Jones P.K., Jackson K.S. *J. Lipid Res.* 2010, no. 2, pp. 334–344.
9. Brass D.M., Hollingsworth J.W., Cinque M., Li Z., Potts E., Toloza E., Foster M. W., Schwartz D. A. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* 2008, no. 5, pp. 584–590.
10. Liebers V., Raulf-Heimsoth M., Brüning T. *Arch. Toxicol.* 2008, no. 4, pp. 203–210.
11. Möller W., Heimbeck I., Hofer T.P.J., Saba G.K., Neiswirth M., Frankenberger M., Heitbrock L.Z. *PLoS One.* 2012, Vol. no. 4, e33505.
12. Wei S.D., Li J.Z., Liu Z.J., Chen Q., Chen Y., Chen M., Gong J.P. *Hepatology Res.* 2011, no. 10, pp. 989–999.

### Рецензенты:

Мальков П.Г., д.м.н., профессор, заведующий централизованной окружной лабораторией патоморфологии и цитологии ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр №6» Департамента здравоохранения Москвы, г. Москва;

Яковлев А.Т., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФКУЗ «Волгоградский НИПЧИ», г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 07.11.2012.