С.К.Соодаева, Е.А.Острахович

РОЛЬ СВОБОДНОГО ЖЕЛЕЗА В ПРОЦЕССАХ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АСБЕСТА

НИИ пульмонологии МЗ и МП РФ

ROLE OF FREE FERRUM IN PEROXIDE LIPID OXIDATION PROCESSES DURING ASBESTOS INFLUENCE

S.K.Sohodaeva, E.A.Ostrakhovich

S u m m a r y

The ferrous ion content in blood serum and free liver ferrum and their interaction with changes of peroxide lipid oxidation (PLO) processes in hepatic and pulmonary tissue were studied during various periods of chrysotil—*asbestos* influence. The effect of natural rhotinum flavonoid from P-vitamin on these parameters was also investigated.

The free ferrum pool state was studied by EPR-spectroscopy with nitrozil g-factor complex (2.03) formation evaluation.

After a month, the significant increase of oxyprolin in the pulmonary tissue was found after a single intratracheal injection of 50mg of powder. The enforcement of peroxidation processes in hepatic and pulmonary tissues was also found (at 1.4 and 1.7 times respectively). The total ferrum content in blood serum corresponded to the control value. Moreover, the transferrin content was decreased at 1.3 times, that testify about the ferric content decrease in blood serum. The free ferrum content was also low in hepatic tissue. The single rhotinum instillation did not influence on the dust toxic action.

After 6 months since powder inhalation, the enforcement of PLO processes in hepatic and pulmonary tissues was discovered (at 2.8 and 1.5 times respectively). The ferrum content was higher in 20%, that can be explained by its extraction from ferritin. The studied flavonoid showed the expressed anti*asbestos* action after three month therapy only.

Р е з ю м е

Проведено исследование содержания ионов железа сыворотки крови и свободного железа ткани печени и их взаимосвязи с изменением процессов перекисного окисления липидов в тканях печени и легких на различных сроках воздействия хризотил—*асбеста*, а также влияния на эти показатели природного флавоноида рутина, входящего в группу витаминов Р.

Состояние пула свободного железа печени изучали методом ЭПР-спектроскопии (по образованию нитрозильных комплексов с g-фактором 2,03).

Через месяц после однократного интратрахеального введения 50 мг выявлено достоверное увеличение оксипролина в ткани легких, обнаружено также усиление процессов пероксидации в ткани печени и легких (в 1,4 и 1,7 раза соответственно). Уровень общего железа в сыворотке крови соответствовал контрольному значению, при этом уровень трансферрина был снижен в 1,3 раза, что свидетельствует о снижении двухвалентного железа в сыворотке. Уровень свободного железа в ткани печени также снижен. Однократная инстиляция рутина не приводит к предотвращению токсического воздействия пыли.

Через 6 месяцев после “запыления” животных было обнаружено усиление процессов ПОЛ в тканях печени и легких (в 2,8 и 1,5 раза соответственно). Уровень железа при этом повышался на 20%, что связано, по-видимому, с высвобождением его из ферритина. Исследуемый нами флавоноид проявил выраженное противоиасбестное действие лишь после трехмесячной терапии.

При воздействии *асбеста* на организм происходит усиление свободнорадикальных процессов (СРП) [9,12,13]. Ингалированные частицы взаимодействуют с альвеолярными макрофагами, приводя к увеличению потребления кислорода и генерации активных форм кислорода (АФК) клетками [5]. Образующиеся АФК способны окислять ненасыщенные жирные кислоты

как фосфолипидов, входящих в состав плазмалеммы фагоцитов, так и фосфолипидов сурфактанта. Кислородные радикалы регулируют интенсивность фиброобразования, принимая участие на различных этапах этого многоступенчатого процесса, в частности гидроксильный радикал участвует в реакциях прямого окисления пролина и лизина в оксипролин и оксилизин

аминокислот, входящих в состав коллагенового волокна [5]. В настоящее время ясно, что для инициации реакций свободнорадикального окисления в биологических системах необходимо как присутствие кислородных радикалов, так и ионов железа и функции этих двух составляющих взаимосвязаны. Наличие ионов железа и образование кислородных радикалов являются необходимым и достаточным условием появления в клетке цитотоксических радикалов липидов, а также модификации белков [2,15]. В настоящее время существует много фактов, свидетельствующих о том, что свободное железо присутствует практически во всех клетках в составе так называемого транзитного пула [1]. Именно этот пул железа, вероятнее всего, участвует во внутриклеточных реакциях перекисного окисления липидов (ПОЛ). Было показано, что изменение содержания эндогенного свободного железа играет важную роль в развитии целого ряда патологических состояний [4,7,14].

В настоящей работе мы исследовали уровень ионов железа и трансферрина сыворотки крови, а также изменение содержания эндогенного свободного железа ткани и их взаимосвязь с изменением процессов ПОЛ в тканях легких и печени при моделировании воспалительного процесса, вызванного асбестом, на разных сроках воздействия. Кроме этого мы изучали эффект природного флавоноида рутин на эти показатели.

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах-самцах, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на три группы: 1-я — контрольные животные, которым интратрахеально вводили 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия; 2-я — крысам вводили асбест Баженовского месторождения с длиной волокон не более 10 мкм однократно интратрахеально в количестве 50 мг/мл изотонического раствора хлорида натрия, нагретого до 37°C; 3-я — крысам вводили асбест Баженовского месторождения в количестве 50 мг/мл 1 мМ раствора рутина и с 3-го месяца внутрижелудочно вводили 1 мл 1 мМ раствора рутина ежедневно. Через 1 месяц и 6 месяцев крыс выводили из опыта с помощью эфирного наркоза, декапитировали, печень и легкие перфузировали изотоническим раствором хлорида натрия и готовили гомогенат 6% и 3% соответственно. Определение ТБК-активных продуктов проводили по методу [11] в следующей модификации: 0,25 мл исследуемого образца

смешивали с 3,0 мл 1,5% раствора фосфорной кислоты и 1,0 мл 0,5% раствора тиобарбитуровой кислоты. Пробы тщательно перемешивали и инкубировали 45 минут при 100°C, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 4 мл н-бутанола, встряхивали и центрифугировали при 1800 г. Верхнюю бутанольную фракцию отбирали для измерения оптической плотности при 532 нм. Измерения проводили на спектрометре "LKB Biochrom Ultrospec 4050". Для получения сыворотки кровь собирали в центрифужные пробирки, инкубировали при 37°C в течение 30 минут для лучшей ретракции тромба. Затем отделяли сыворотку центрифугированием при 1800 г. Уровень общего железа в сыворотке определяли по методу [10]. Образцы сыворотки замораживали в жидком азоте в виде таблеток [3]. Спектры ЭПР сыворотки крови регистрировали на радиоспектрометре "Varian E-4" при следующих условиях: СВЧ-мощность 10 мВт, амплитуда модуляции 10 Гс, постоянная времени 1 с, усиление $2,5 \cdot 10^3$, скорость развертки поля 250 Гс/мин. Для определения концентрации свободного железа образцы тонких срезов печени обрабатывали 50% раствором нитрита натрия в соответствии с методикой [6]. Обработанные нитритом натрия срезы инкубировали 20 мин при 20°C, затем инкубировали еще 7 минут при 45°C. Спектры ЭПР полученных образцов записывали при температуре жидкого азота на спектрометре "Varian E-4". Амплитуду низкочастотной компоненты сигнала ЭПР с $g=2,03$ считали как описано в работе [6], пропорциональной концентрации свободного железа. Уровень оксипролина в ткани легкого определяли по методу [16].

Через 1 месяц после однократного интратрахеального введения асбеста наблюдалось достоверное увеличение содержания оксипролина в ткани легких, что указывает на протекание фиброзного процесса (таблица). Уровень общего железа в сыворотке крови при воздействии асбеста соответствовал контрольному значению, при этом уровень трансферрина был снижен в 1,3 раза, что свидетельствует о снижении количества двухвалентного железа в сыворотке. К концу 4-й недели выявлено усиление процессов ПОЛ в тканях печени и легких (в 1,4 и 1,7 раза соответственно) по сравнению с контролем. Для выяснения причин активации ПОЛ в печени исследовали изменения пула свободного негемового железа, измеренного методом

Т а б л и ц а

Изменение концентрации железа, оксипролина, показателей ПОЛ при воздействии асбеста в различные сроки

Исследуемые параметры	Через 1 месяц			Через 6 месяцев		
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Оксипролин, мг/100 г легк.	222±26	395±49	392±55	270±21	733±34	449±26
ПОЛ легк., нМ/гр.тк.	198±40	320±48	318±38	241±28	669±78	280±32
ПОЛ печ., нМ/гр.тк.	421±20,4	528±15,9	502±18,6	645±11	957±58	370±35
Свободн. железо печени, отн. ед.	105±5,6	75,5±7,6	73,3±4,2	68,5±2,4	80,8±3,5	62,5±7,3
Железо сыворотки, нМ	22,1±3,0	21,7±3,4	19,9±3,5			
Трансферрин, отн. ед.	9,8±0,9	6,4±0,2	6,4±0,7			

динитрозильных комплексов. Обработка целой ткани окисью азота приводит к появлению там парамагнитных комплексов, характеризующихся сигналом ЭПР с $g=2,03$. Этот сигнал обусловлен образованием комплекса, включающего две SH-группы, один атом двухвалентного железа и две молекулы NO. При избытке окиси азота образование нитрозильных комплексов в тканях лимитировано количеством свободного железа, но не SH-группами белка. Ионы трехвалентного железа, а также железо, входящее в состав железо-серных центров цепей переноса электронов, в образовании нитрозильных комплексов участия не принимают. Обнаружено, что к концу 1-го месяца снижается уровень негемового железа в ткани печени во 2-й группе животных, получавших асбест, и в 3-й группе, получавших асбест с рутином, в 1,4 раза по сравнению с контролем.

Соответствие уровня общего железа в сыворотке крови крыс, получавших асбест, контрольной группе не является показателем отсутствия нарушений метаболизма ионов железа, так как мы измеряли лишь стационарную концентрацию, а уменьшение концентрации трансферрина и пула негемового железа в ткани печени свидетельствуют об увеличении скорости утилизации железа. В кровь железо поступает в форме Fe(II), окисляется церулоплазмином и связывается с апотрансферрином. Церулоплазмин и трансферрин функционируют как единая антиоксидантная система, механизм действия которой основан на утилизации двухвалентного железа. Подавляющая доля железа, попадающего в клетку, инкорпорируется в составе специфического белка — ферритина, часть остается в свободном состоянии, которая образует так называемый транзитный пул железа. Именно железо транзитного пула, вероятнее всего, участвует во внутриклеточных реакциях пероксидации липидов. Уменьшение уровня свободного железа в ткани печени, возможно, свидетельствует о том, что часть ионов железа расходуется на активацию ПОЛ.

Через 1 месяц у животных после интратрахеального введения асбеста с рутином все измеренные показатели практически соответствовали таковым у животных, получавших только асбест. Таким образом, однократная инстиляция рутином не приводит к предотвращению токсического воздействия пыли.

Через 6 месяцев после запыления наблюдается усиление фиброобразования в легких, о чем можно судить по значительному увеличению оксипролина в легочной ткани. Кроме этого было обнаружено усиление процессов пероксидации липидов в тканях легких и печени (в 2,8 и 1,5 раза соответственно). Уровень свободного железа ткани печени повышается на 20%, что может быть связано с высвобождением Fe(II) из ферритина, известно, что двухвалентное железо является

мощным катализатором образования OH-радикалов. В результате чего и наблюдается значительное увеличение продуктов ПОЛ. Освобождение железа из ферритина уменьшается в присутствии хелаторов железа, в частности рутина, что приводит к ингибированию пероксидации [8]. У животных, получавших в течение 3 месяцев рутин, было снижено количество ТБК-активных продуктов в тканях легких и печени, содержание свободного железа соответствовало контрольным значениям.

Таким образом, в результате воздействия асбеста через 1 месяц наблюдается снижение уровня трансферрина сыворотки крови и свободного железа в ткани печени, что, возможно, приводит к усилению процессов пероксидации. Через 6 месяцев после однократного интратрахеального введения асбеста животным, помимо значительного увеличения перекисного окисления липидов в тканях печени и легких, обнаружено повышение содержания свободного железа, что связано, по-видимому, с высвобождением его из ферритина.

Исследованный нами природный флавоноид рутин проявляет выраженное противоасбестное действие лишь после трехмесячной терапии, не оказывая эффекта после однократной инстиляции вместе с асбестом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванин А.Ф., Варич В.Я. // Биофизика.— 1979.— Т.24, № 4.— С.666.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.
3. Коваленко О.А., Анфалова Т.В., Соколов В.С. и др. // Биофизика.— 1971.— Т.16, № 4.— С.663.
4. Козлов А.В., Вдовин А.В., Азизова О.А. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1987.— № 8.— С.165—167.
5. Коркина Л.Г., Величковский Б.Т. // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине.— Рига, 1988.— С.153—163.
6. Тарасова Н.И., Коваленко О.А., Ванин А.Ф. // Биофизика.— 1981.— Т.26, № 4.— С.678—682.
7. Alleman M.A., Koster J.E., Wilson J.H.P. et al. // Biochem. Pharmacol.— 1985.— Vol.34, № 2.— P.161—166.
8. Biemond P., Smaak A.J.G., van Eijk H.G. // Free Radical Biol. Med.— 1988.— Vol.4, № 3.— P.185—195.
9. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. // Free Radical in Biology and Medicine.— Oxford: Clarendon Press, 1989.— P.473—478.
10. Johnson D.J. // Clin. Chim. Acta.— 1990.— Vol.189, № 2.— P.199—203.
11. Michara M., Vchiyama M., Fukuzawa K. // Biochem. Med.— 1980.— Vol.23, № 3.— P.302—311.
12. Mossman B.T., Marsh J.P., Shatos M.A. // Lab. Invest.— 1986.— Vol.54, № 2.— P.204—212.
13. Mossman B.T., Bigman J., Corn M. et al. // Science.— 1990.— Vol.247.— P.294—301.
14. Nayini N.R., White B.C., Aust S.D. et al. // Free Radical Biol. Med.— 1985.— Vol.1, № 2.— P.111—116.
15. Richards D.M.C., Dean R.T., Yessup W. // Biochim. Biophys. Acta.— 1988.— Vol.964, № 2.— P.281—289.
16. Stegeman H. // Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.— 1958.— Bd 311.— S.41—45.

Поступила 26.12.94.