

Влияние диоксида серы на секрецию новосинтезированных холинсодержащих липидов альвеолоцитами II типа

Белорусский государственный медицинский университет

Диоксид серы один из наиболее опасных загрязнителей атмосферного воздуха и окружающей среды. Экспериментально изучено влияние диоксида серы на секрецию новосинтезированных холинсодержащих липидов альвеолоцитами II типа. Диоксид серы в концентрации 0,01 мг/м³ не оказывал значительных изменений на секрецию фосфатидилхолина, основного компонента легочного сурфактанта. Концентрация поллютанта 0,5 мг/м³ приводила к снижению как базальной, так и стимулированной секреции.

Ключевые слова: диоксид серы, альвеолоциты II типа, сурфактантная система, синтез, секреция

Серьезную проблему для здоровья населения создают выбросы в атмосферу диоксида серы. Многие эпидемиологические исследования указывают на тесную связь между содержанием диоксида серы в воздухе и возрастанием заболеваемости органов дыхания. Клетки легких, контактирующие с вдыхаемым воздухом, функционируют в определенной среде, которую создает для них сурфактантная система, включающая альвеолоциты II типа (А-2). Сурфактант выстилает тонким слоем поверхность альвеол и, благодаря высокой поверхностной активности, препятствует их спаданию в период уменьшения легочного объема при дыхании. Для поддержания монослоя сурфактанта в плоскости альвеол на границе раздела воздух-жидкость необходима его постоянная секреция из места синтеза – альвеолоцитов II типа.

Анализ литературных данных показал, что до нашего исследования оценка повреждающего действия диоксида серы на альвеолоциты II типа не проводилась. Мы предполагали, что А-2, как клетки, ответственные за синтез и секрецию сурфактанта могут оказаться наиболее уязвимым звеном в цепи патологического воздействия SO₂. Поэтому целью нашего исследования было выяснение влияния диоксида серы на стимулированную и базальную секреторную способность альвеолоцитов II типа.

Материал и методы

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар, массой 170-190 г. Крысы в течение 66 суток подвергались непрерывному ингаляционному воздействию диоксида серы в концентрации 0,01; 0,05 и 0,5 мг/м³. Затравку животных осуществляли в специально сконструированных 200-литровых камерах с дозированной подачей сернистого ангидрида. Выбор концентраций диоксида серы в затравочных камерах обусловлен всем диапазоном реально имеющих уровней загрязнения атмосферного воздуха.

Материалом для исследования служили изолированные альвеолоциты II типа, выделенные из легких контрольных и опытных животных. Выделение клеток из измельченной легочной ткани основывалось на методе Dobbs L. G. et al [1]. Изолированные альвеолоциты II типа сохраняют свои физиологические свойства как популяция активно секретирующих клеток. В качестве специфического предшественника сурфактанта был использован 3Н-метил-холин. Молекулы этого

соединения интенсивно включаются только в главный липидный компонент сурфактанта – фосфатидилхолин (ФХ). Выделенные клетки инкубировали в течение 22 часов в ДМЕ-среде с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка и 3Н-метил-холина (1мккю/культуральную чашку). Плотность клеточной суспензии составляла 106 клеток / 1,6 мл / чашку. Спустя этот период времени (фаза синтеза) прилипшие клетки промывали средой ДМЕ, после этого в чашки вносили свежую среду ДМЕ без добавки радиоактивного материала. Для последующей оценки базальной и стимулированной секреторной способности клетки инкубировали в течение трех часов. В качестве стимуляторов секреции сурфактанта использовались: тербуталинсульфат, тетрадеcanoил-форболацетат (ТРА), циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (ц-АМФ), аденозинтрифосфат (АТФ). Вносимые в культуру регуляторы первоначально разводились с использованием изотонического раствора NaCl и раствора диметилсульфоксида (ДМСО). Это обстоятельство предопределило состав контрольных проб (базальная секреция ФХ).

Все стимуляторы вносились в культуральные флаконы в одинаковом объеме. По завершении секреторной фазы культуральную жидкость отсасывали с чашек и центрифугировали. Последующему анализу подвергались получаемый супернатант и клетки, оставшиеся на чашках. Из них экстрагировали фосфолипиды методом Folch et al., поскольку меченый холин встраивался в фосфатидилхолины. Экстрагированные таким образом фосфолипиды учитывали путем обсчета в жидкостном сцинтилляционном счетчике. Подсчет секреторной способности А-2 проводили по формуле:

$$\frac{RA \text{ клеток}}{RA \text{ клеток} + RA \text{ среды} \times 2,67} \times 100\%$$

где RA клеток – радиоактивность А-2; RA среды-радиоактивность среды (распады /мин), в которой инкубировались клетки в течение 3 часов.

Результаты и обсуждение

Использование изолированных клеток легких и их культуры в качестве модельной системы позволило оценить влияние диоксида серы на центральное звено клеточного метаболизма сурфактанта – альвеолоциты II типа.

После воздействия на экспериментальных животных диоксида серы в концентрации 0,01 мг/м³ наблюдалось повышение базальной секреции новосинтезированного ФХ первичной культурой А-2 в 1,4 раза относительно контроля (p < 0,05) (рис.1.А). При концентрации SO₂ в воздухе 0,05 мг/м³, напротив, отмечалась тенденция к снижению секреции. Более высокое загрязнение воздуха диоксидом серы (0,5 мг/м³) приводило к угнетению секреции ФХ клетками легких. В этих условиях отмечалось статистически достоверное снижение уровня базальной секреции не только относительно контроля (в 1,5 раза), но и относительно концентрации 0,01 мг/м³ (в 2 раза).

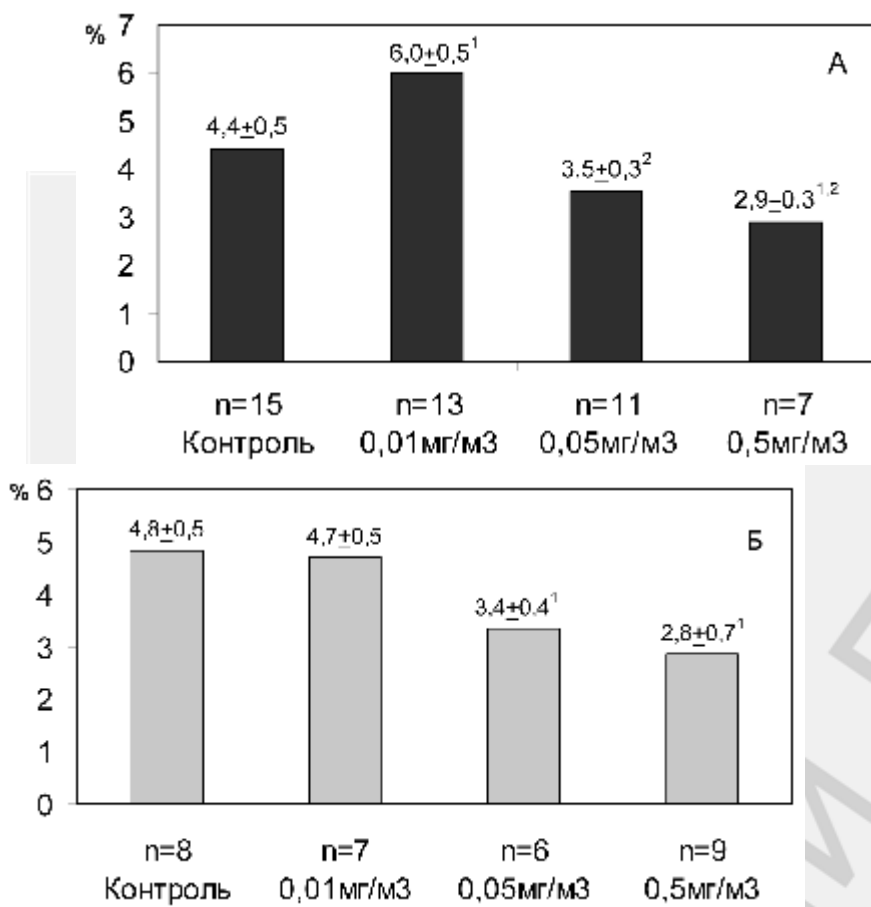


Рис. 1. Влияние диоксида серы на интенсивность базальной секреции новосинтезированных холинсодержащих липидов А – изотонический раствор, Б – 0,025% водный раствор диметилсульфоксида Примечание. А-2 выделялись из легких крыс, подвергнутых хроническому вдыханию SO₂ в течение 3 – 66 суток. Каждое значение суммарный показатель этой динамики. 1-р < 0,05 по сравнению с контрольной группой; 2-р < 0,05 по сравнению с – 0,01 мг/м³.

При инкубации А-2 с использованием раствора ДМСО, после хронического вдыхания экспериментальными животными SO₂ в концентрации 0,01 мг/м³, уровень базальной секреции не претерпел значительных изменений (рис.1.Б). Однако, после затравки диоксидом серы в концентрации 0,05 и 0,5 мг/м³ отмечалось прогрессирующее угнетение секреции, в 1,4 и 1,7 раза соответственно по сравнению с контролем (р < 0,05). Таким образом, опыты по оценке базальной секреции новосинтезированного ФХ А-2 показали нарастающее ее снижение, начиная с концентрации SO₂ 0,05 мг/м³.

Существуют физиологические и фармакологические вещества, которые стимулируют секрецию сурфактанта изолированными А-2. В присутствии стимуляторов скорость секреции может возрастать в несколько раз. Все использованные в опытах стимуляторы действительно повышали долю секретированных альвеолоцитами меченых фосфолипидов по сравнению с базальной секрецией. Наибольшим стимулирующим действием обладал ТРА.

Один из механизмов стимуляции секреции включает активацию аденилатциклазы, образование цАМФ и последующую активацию цАМФ-зависимой протеинкиназы (протеинкиназы А) [2, 3]. Этот путь активируется аденозин А2В и ?-адренергическими рецепторами, находящимися на клеточной поверхности А-2.

Полученные нами данные по оценке влияния различных концентраций диоксида серы на стимулированную цАМФ секрецию новосинтезированных фосфолипидов

показали, что концентрация SO₂ 0,01 мг/м³ практически не оказывала влияния. Однако, ее увеличение до 0,05 мг/м³ приводило к статистически достоверному угнетению секреции ФХ А-2 в 1,4 раза не только по сравнению с контролем, но и относительно концентрации 0,01 мг/м³ SO₂. При более высокой концентрации диоксида серы 0,5 мг/м³ отмечалась лишь тенденция к снижению стимулированной цАМФ секреции.

Несмотря на то, что цАМФ и β -адренергический стимулятор тербуталин имеют общий механизм регуляции секреции, ожидаемого сходства сдвигов при воздействии диоксида серы на стимулированную секрецию не выявлено. Если в опытах с применением цАМФ достоверное угнетение синтеза и секреции фосфолипидов наблюдалось при концентрации 0,05 мг/м³, то в этих же условиях уровень секреции, стимулированной тербуталином, не изменялся (таб.1). В то же время интенсивность секреции снижалась в 2 раза по сравнению с контролем при воздействии на крыс 0,5 мг/м³ диоксида серы.

Таблица 1

Концентрация SO ₂	АТФ	цАМФ	ТРА	Тербуталин
	M ± m (%)			
Контроль n	5,26 ± 0,64 17	5,29 ± 0,60 17	8,57 ± 1,08 10	6,54 ± 1,37 11
0,01 мг/м ³ n	5,03 ± 0,65 14	5,09 ± 0,51 14	5,92 ± 0,44* 12	4,42 ± 0,41 12
0,05 мг/м ³ n	4,86 ± 0,42 14	3,66 ± 0,23* 13	4,73 ± 0,60* 11	6,65 ± 0,99 13
0,5 мг/м ³ n	3,53 ± 0,34* 14	4,04 ± 0,33 10	4,95 ± 0,64* 10	3,18 ± 0,40* 8

Примечание: Представленные в таблице значения представляют долю секретированных в общем количестве новосинтезированных альвеолоцитами (клетки + среда) меченых фосфатидилхолинов. Альвеолоциты 2 типа выделялись из легких крыс, подвергнутых хроническому вдыханию SO₂ в течение 3 – 66 суток. Каждое значение – суммарный показатель этой динамики. * – p < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

Другой механизм регуляции секреции лежит в основе действия АТФ и ТРА, наиболее эффективных стимуляторов секреции (в 4 раза выше уровня базальной секреции) [4, 5]. ТРА и АТФ активируют протеинкиназу С и более эффективны, чем те стимуляторы, действие которых опосредуют другие протеинкиназы. При воздействии на животных диоксида серы наблюдалось прогрессирующее снижение секреции холинсодержащих липидов, стимулированной ТРА (таб.1). Так, уже при концентрации SO₂ 0,01 мг/м³ уровень секреции статистически достоверно снижался, в 1,4 раза по сравнению с контролем. Повышение концентрации диоксида серы до 0,05 мг/м³ приводило к дальнейшему снижению доли секретированных в общем количестве новосинтезированных А-2 холинсодержащих липидов (в 1,8 раза). Аналогичное угнетение секреции, стимулированной ТРА, отмечалось и в случае затравки животных SO₂ в концентрации 0,5 мг/м³ (в 1,8 раза по сравнению с контролем, p < 0,05).

Диоксид серы в концентрациях 0,01 и 0,05 мг/м³ практически не оказывал влияния на уровень стимулированной АТФ секреции холинсодержащих липидов

(таб.1). Можно лишь отметить незначительную тенденцию к снижению секреции при концентрации SO₂ 0,05 мг/м³. Повышение концентрации диоксида серы во вдыхаемом животными воздухе до 0,5 мг/м³ приводило к статистически достоверному угнетению синтеза и секреции фосфолипидов А-2 в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Выводы

1. Диоксид серы оказывает влияние на все сигнальные механизмы сурфактантной секреции.
2. При концентрации SO₂ в воздухе 0,01 мг/м³ секреция новосинтезированных фосфатидилхолинов, стимулированная цАМФ и АТФ не претерпела значительных изменений. Вместе с тем наблюдается статистически достоверное снижение секреции, стимулированной ТРА.
3. Более высокое загрязнение воздуха диоксидом серы, 0,05 мг/м³, приводит к снижению секреции, стимулированной цАМФ и ТРА ($p < 0,05$).
4. Наиболее значительные изменения в регуляции синтеза и секреции холинсодержащих липидов А-2 наблюдаются при концентрации 0,5 мг/м³ SO₂ во вдыхаемом воздухе. В этих условиях отмечается статистически достоверное снижение как базальной, так и стимулированной секреции (АТФ, тербуталин, ТРА).

Литература

1. Dobbs L.G., Gonzalez R., Williams M.C. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity // *Am. Rev. Respir. Dis.* 134.-1986.-P. 141-145.
2. Gobran L.I., Rooney S.A. Adenylate cyclase-coupled ATP receptor and surfactant secretion in type II pneumocytes from newborn rats // *Am. J. Physiol.*-1997.-Vol. 272, № 1.-P. 187-196.
3. Rooney S.A. Regulation of surfactant secretion // *Comp. Biochem. Physiol.*-2001.-Vol. 129, pt. A.-P. 233-243.
4. Gobran L.I., Rooney S.A. Surfactant secretagogue activation of protein kinase C isoforms in cultured rat type II cells // *Am. J. Physiol.*-1999. – Vol. 276, № 1, pt. 2.-P. 251-256.
5. Mason R.J., Voelker D.R. Regulatory mechanisms of surfactant secretion // *Biochim. Biophys. Acta.*-1998.-Vol. 1408, № 2.-P. 226-240