

Т. Ю. Гоц

## Вплив озону та токсичних часток повітря на дихальні шляхи мишей

*Нами розроблялась гіпотеза о том, что влияние токсических частиц воздуха может способствовать развитию астмоподобных симптомов. Мышам линии Balb/c однократно эндотрахеально вводились токсические частицы воздуха, оксида титана или же они подвергались влиянию низких концентраций озона. Было установлено, что под влиянием токсических частиц воздуха усиливается ответная реакция бронхов на введение метахолина. Реактивность бронхов оставалась неизменной после воздействия частиц оксида титана и озона. Полученные результаты расширяют представления о механизмах влияния факторов окружающей среды на дыхательные пути.*

### ВСТУП

Більшість дослідників вважають, що зростання смертності, госпіталізації та звернень до лікаря з приводу бронхіальної астми (БА) та інших алергічних станів відображає істинну картину підвищення кількості цих захворювань [2, 4]. Причини розвитку такої тенденції не зовсім зрозумілі, однак переважає думка, що вони багатofакторні [1, 7]. До цього часу накопичено достатньо відомостей і доказів, які доводять, що, поряд з іншими причинами, вплив факторів навколишнього середовища є одним із головних.

Відомо, що токсичні речовини, які вдихаються разом із повітрям, здатні дезінтегрувати епітеліальний бар'єр дихальних шляхів, збільшуючи при цьому інгаляцію алергенів та ранню сенсibilізацію організму. Існування такої можливості доведено в дослідях на мишах та собаках, коли вплив різних концентрацій озону підсилював сенсibilізацію тварин до алергену, який вдихався [21]. Глибше проникнення алергену також пов'язується з властивістю озону підсилювати реакцію пацієнтів у відповідь на ендотрахеальне введення алергену [15]. Було показано, що для

розвитку бронхоконстрикції хворим на БА потрібна значно менша концентрація SO<sub>2</sub> [14], ніж здоровим людям. У результаті було зроблено висновок про те, що бронхіальна гіперчутливість на неспецифічні інгаляційні стимули асоціюється з розвитком астми.

Реактивність бронхів тривалий час вважалася незмінною генетично зумовленою функцією до тих пір, поки не були проведені дослідження, які виявили, що збільшення реактивності бронхів може бути викликано у здорових людей внаслідок впливу вірусних респіраторних інфекцій, а також короткочасного впливу озону [9,20].

Так, озон виявився "підозрюваним" зовнішнім агентом, вплив якого, навіть, у дуже низьких концентраціях провокував розвиток запалення в дихальних шляхах [6] і підсилював гіперреактивність дихальних шляхів у здорових осіб і у хворих на БА [10].

Нині накопичено значну кількість даних епідеміологічних і клінічних досліджень, які свідчать про те, що під час періодичних підвищень вмісту озону в атмосфері спостерігається посилення вираженості симптомів БА [7]. Більше того, при проведенні клінічних досліджень з вивчення дозованого впливу

озону встановлено зв'язок між виявленням озону і зниженням об'єму форсованого видиху за 1 с [17].

Серед дітей хворих на респіраторні захворювання виявлено значну залежність від концентрації токсичних часток у повітрі [3]. Іншими авторами встановлено зв'язок між наявністю токсичних часток діаметром меншим за 10 мкм в атмосфері та щоденною вираженістю респіраторних симптомів, хоча під час дослідження концентрація часток була нижчою від допустимого рівня [19]. У зимовий період у разі захворювань верхніх і нижніх дихальних шляхів вираженість симптомів значно підсилювалась при збільшенні токсичних часток у повітрі [5,18].

Внаслідок обмеження можливостей вивчення впливу озону та інших токсичних речовин на організм людини, різноманітні лінії мишей є найбільш придатними для вивчення структурних і функціональних змін у відповідь на вплив зовнішніх факторів на дихальні шляхи. В дослідках з використанням антиген-сенсibiliзованих мишей лінії Balb/c було показано, що сенсibiliзація цих тварин алергеном призводить до розвитку гіперреактивності дихальних шляхів, яка супроводжується вираженим легневим запаленням з участю еозинофілів і Т-лімфоцитів [22]. Окрім того, було встановлено існування залежності між дисфункцією дихальних шляхів і розвитком Ig E-залежної імунної відповіді у мишей цієї лінії [13]. Це дозволило нам вважати лінію мишей Balb/c найбільш придатною для вивчення змін реактивності дихальних шляхів на вплив факторів навколишнього середовища.

Метою нашого дослідження було вивчення впливу зовнішніх факторів – озону та токсичних часток повітря - на дихальні шляхи на мишах лінії Balb/c.

## МЕТОДИКА

Для проведення дослідження були використані миші-самці лінії Balb/c (Jackson Laboratories, США) віком 9-10 тиж і масою 20 г.

Мишей утримували в мікроізоляторах по 3-4 особини не менше ніж три доби до проведення експерименту на стандартній сухій лабораторній дієті.

У процесі проведення експерименту мишей піддавали впливу озону в спеціальних 0,75<sup>3</sup> пересувних камерах з нержавіючої сталі типу Laskin (Wahmann, США) за методикою Kirichenko [11].

Озон генерували за допомогою озонатора OREC Model 03V1-0 з використанням стиснутого чистого кисню. Надходження озону в камеру контролювали флоуметром, а його концентрацію всередині камери підтримували за допомогою аналізатора Dasibi Model 1008 (Dasibi Environmental Corp., США). Необхідну концентрацію озону досягали протягом 10 хв і підтримували на рівні  $\pm 10\%$  під час всього експерименту.

З метою дозованої і точної інфузії часток оксиду титану і токсичних часток повітря був вибраний метод внутрішньотрахеального введення.

Після проведення анестезії шкіру шиї мишей виголювали на ділянці над трахеєю і розрізали хірургічним лезом. Досліджені токсичні частки повітря або оксид титану розчиняли в 50 мкл 0,9%-го розчину хлориду натрію до створення необхідної концентрації і вводили 1 мл шприцем у трахею. Шкірний розріз зашивали кетгутом та дезінфікували антибіотиком. Миші прокидалися після припинення дії анестетика в середньому через 20-40 хв. Успішне проведення даної процедури становило 95%.

Для визначення неспецифічної гіперреактивності дихальних шляхів мишей у відповідь на вплив токсичних часток повітря або озону на мишах був проведений провокаційний дихальний тест з використанням ваготонічного агента метахоліну хлориду. Дослідження реакції відповіді легенів тривало близько 45 хв. Протягом цього часу середній об'єм введеної рідини становив 1,2 мл для кожної тварини. Значення резистентності та еластичності бронхів визначались як функція впродовж часу та розраховувалися за допомогою алгоритму. Зміни резистентності дихальних шляхів та їх динамічної еластичності

на внутрішньовенне введення метахоліну хлориду (фірми "Sigma Chemical Co.", США) у різних концентраціях, від 6 до 3200 мкг/кг, аналізували та зберігали у комп'ютерній базі даних з використанням програмного забезпечення ANADAT - SABDAT (RHT- Infodat, Канада).

Криву дозозалежної відповідної реакції на введення метахоліну будували на основі резистентності дихальних шляхів як показника калібру дихальних шляхів. Збільшення значення цього показника на 100% порівняно з фізіологічним розчином і максимальний бронхозвужуючий ефект приймали за зміну опірності дихальних шляхів.

Використані в експериментах токсичні частки повітря (код1648) були отримані з Національного інституту стандартів і технологій, США. Вони виготовлялися з пилових часток повітря, зібраних у спеціальні уловлювачі, розроблені для цієї мети. Матеріал збирали протягом 12 міс в урбанізованих районах штату Міссурі, США. Після видалення з окремих фільтрувальних мішечків частки з'єднували в один об'єм і фільтрували для видалення домішок, а потім старанно подрібнювали. Вміст компонентів, які складали пил, визначали на основі результатів виміру концентрації елементів двома або більше незалежними методами. Геометричний діаметр часток у середньому склав 0,4 x 1,1 мкм. Основними хімічними елементами, які містилися у ньому, були: Si, S, Fe, Al, K; у незначних кількостях визначалися Mg, Pb, Na, Zn та інші - усього 12 елементів.

Як негативний контроль ми використовували частки оксиду титана (TiO<sub>2</sub>), надані Службою

інформації, з твердих часток (Kingston, США). Середній діаметр часток TiO<sub>2</sub> становив 0,45 мкм.

Статистичну різницю між контрольними й експериментальними зразками розраховували на основі аналізу варіабельності (ANOVA) після визначення коефіцієнту t Стьюдента. Розходження вважалися достовірними при P<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення впливу озону на реактивність дихальних шляхів миші.

Використовували три групи мишей по 9 особин у кожній. Перша група (контроль) складалася з мишей, які піддавалися впливу лише атмосферного повітря. У другій групі мишей піддавали одноразовому впливу озону в дозі 0,5 ppm (parts per million, молекул на мільйон) протягом 3 год. Мишей третьої групи піддавали впливу озону в дозі 0,5 ppm 2 год за добу протягом 4 діб. Дослідження реактивності дихальних шляхів проводили на п'яту добу. Клітини кожної групи мишей, що складалася з трьох особин, бралися, як один зразок. Протокол проведення дослідження повторювали шість разів.

Результати дослідження впливу озону на зміну реактивності дихальних шляхів у від-

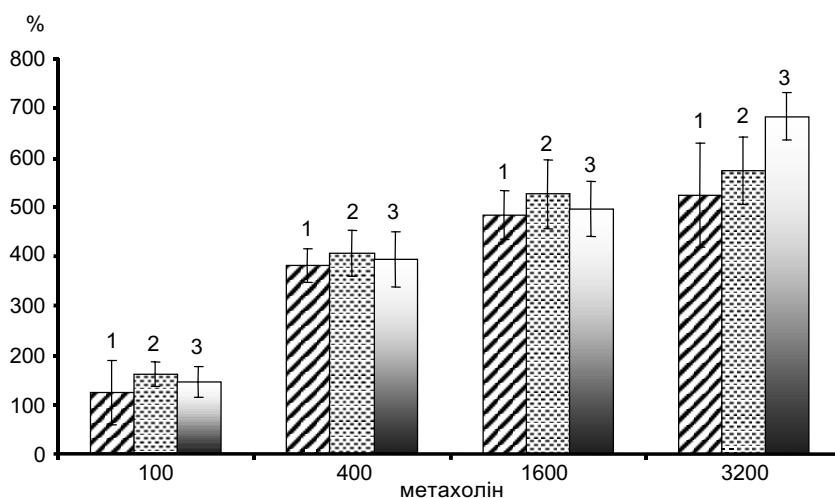


Рис. 1. Вплив озону на зміну реактивності дихальних шляхів під впливом метахоліну (мкг/кг) в мишей лінії Balb/c: 1 – повітря, 2 – озон 0,5 ppm протягом 3 год, 3 – озон 0,5 ppm, 2 год протягом 4 діб.

повідь на введення метахоліну представлені на рис. 1.

Однократний вплив озону в дозі 0,5 ppm протягом 3 год не викликав значних змін реактивності дихальних шляхів миші на введення метахоліну і становив  $573,9\% \pm 69,5\%$ , що відповідає значенню в контрольній групі  $523,4\% \pm 48,5\%$ .

Навіть після впливу озону протягом 4 діб у дозі 0,5 ppm 2 год за добу зміни реактивності дихальних шляхів на введення метахоліну вірогідно не відрізнялися від попередніх досліджень і становили  $683,2\% \pm 105,8\%$ .

Таким чином, вплив озону в досліджуваних концентраціях не призвів до значної зміни реактивності дихальних шляхів миші у відповідь на введення метахоліну.

У проведених раніше експериментах було встановлено, що в людини збільшення реактивності дихальних шляхів після впливу озону рідко продовжувалося понад 24 год [12]. Отже, виявлена нами незначна зміна відповідної реакції дихальних шляхів у мишей може бути пов'язана з нестійким ефектом наслідків впливу озону.

Вивчення впливу пилових токсичних часток повітря на реактивність дихальних шляхів миші.

Використовували чотири групи мишей по 9 осіб у кожній. Першій групі мишей як контрольній ендотрахеально вводили 50 мкл фізіологічного розчину. Другий контроль складала група мишей, яким вводили 500 мкг  $TiO_2$ . Токсичні частки, які досліджувалися, вводилися ендотрахеально мишам третьої та четвертої груп по 250 і 500 мкл відповідно. Можливі зміни реактивності дихальних шляхів мишей усіх чотирьох груп досліджували на 5-ту добу після введення.

Результати впливу токсичних часток на зміни гіпер-

реактивності дихальних шляхів миші у відповідь на введення метахоліну представлені на рис. 2.

Ендотрахеальне введення фізіологічного розчину й оксиду титану не викликало значних змін з боку дихальних шляхів навіть на високі дози метахоліну. Резистентність дихальних шляхів становила у контрольних групах  $516,3 \pm 75,1$  та  $582,5 \pm 63,1\%$  відповідно. Однократне ендотрахеальне введення токсичних часток повітря викликало вірогідно ( $P < 0,05$ ) значне посилення відповідної реакції дихальних шляхів миші на введення метахоліну. Резистентність дихальних шляхів становила при дозі 250 і 500 мкг  $830,9 \pm 150,2$  і  $1160,0 \pm 265,3\%$  відповідно.

Таким чином, ендотрахеальне введення мишам токсичних часток повітря викликало дозозалежне посилення відповідної реакції дихальних шляхів на введення метахоліну.

Проведені нами дослідження дозволяють припустити можливість участі токсичних часток повітря у розвитку патологічних процесів у дихальних шляхах.

Як відомо, в атмосферному повітрі міститься велика кількість твердих токсичних часток, що утворюються в результаті діяль-

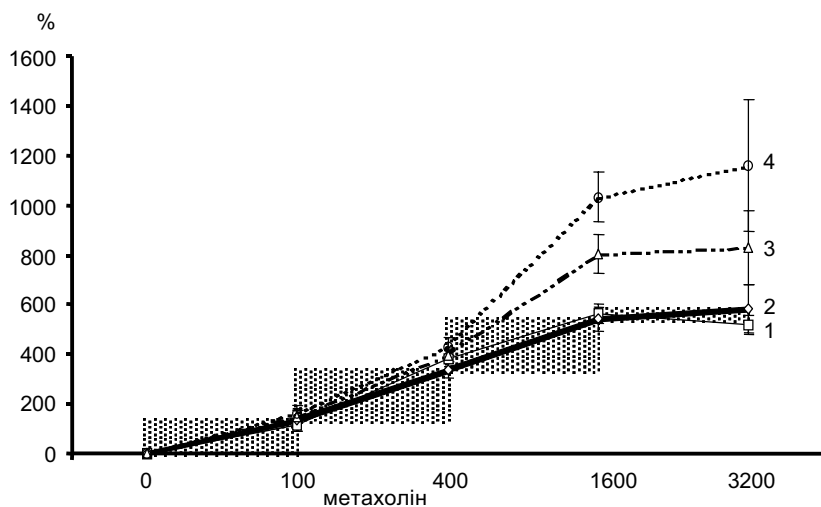


Рис. 2. Вплив оксиду титану і частинок повітря на зміну реактивності дихальних шляхів під впливом метахоліну (мкг/кг) в мишей лінії Balb/c: 1 – фізіологічний розчин, 2 – оксид титану, 3 – 250 мкг частинок 1648, 4 – 500 мкг частинок 1648.

ності людини. Потрапляючи в організм у процесі дихання, вони у великій кількості осідають у дихальних шляхах і, навіть, досягають альвеол. Завдяки своїм мікроскопічним розмірам (діаметр менше ніж 10 мкм), вони мають достатньо велику поверхневу площу, на якій адсорбуються різноманітні токсичні речовини і вільні радикали. Ця обставина зумовлює глибину токсичного uszkodження клітин, що піддаються впливу поверхневих хімічних агентів. Токсичні частки повітря, котрі потрапляють у дихальні шляхи, фагоцитуються альвеолярними макрофагами. Проте фагоцитуюча здатність останніх значно знижується при надлишку часток. Внаслідок цього змінюється тривалість їхнього перебування в легенях, а, отже, збільшується період взаємодії з епітеліальними та іншими клітинами. З іншого боку, вільні радикали, інтенсивність утворення яких залежить від вмісту металів у твердих частках, відповідальні за кисневе uszkodження та активацію макрофагів, що призводить до виділення деяких протизапальних медіаторів. Це, у свою чергу, спричинює розвиток гострої клітинної і "медіаторної" запальної відповіді в дихальних шляхах.

Епітеліальні клітини, контактуючи з токсичними частками, активно їх фагоцитують, в результаті чого посилюється вироблення та звільнення великої кількості прозапальних цитокінів, які надалі посилюють запальну відповідь. Проникаючи в підслизовий шар дихальних шляхів, токсичні частки повітря сприяють збільшенню рівня Ig E, який є пусковим чинником у розвитку алергічного запалення. Внаслідок контакту токсичних часток з інтерстиціальними макрофагами та іншими чутливими популяціями клітин, медіатори запалення, що виділилися і проникли до загального кровотоку, можуть викликати системну запальну відповідь із залученням тромбоцитів крові і факторів згортання, збільшуючи тим самим в'язкість плазми крові.

Дослідження короточасного дозованого впливу озону і твердих токсичних часток повітря на здорових людей [4] виявило на-

явність однотипних симптомів (кашель, біль у грудній клітці при вдиху, скорочення дихання) і зміну функціональних показників (зниження об'єму форсованого видиху за 1 с, зниження життєвої ємкості легень), а також ознаки запалення в слизовій оболонці дихальних шляхів і збільшення вмісту медіаторів і протеїнів у бронхоальвеолярній рідині.

Таким чином, численними є механізми, які ведуть до розвитку гіперреактивності дихальних шляхів у відповідь на навколишні агенти. Клінічні та експериментальні дослідження підтверджують участь деяких механізмів, за допомогою яких чинники навколишнього середовища можуть призводити до порушення функціонування дихальних шляхів. До них відносяться, зокрема, порушення функціонування епітелію та імунокомпетентних клітин, а також залучення й активація клітин, які беруть участь у запаленні.

Висловлюю щиро подяку співробітникам лабораторії токсикології Університету штату Техас, США, за сприяння у проведенні експериментів.

**T.Yu.Gots**

### **THE INFLUENCE OF OZONE AND TOXIC AIRBORNE PARTICULATE MATTER ON AIRWAYS IN MICE**

We tested the hypothesis that exposures to particulate matter and ozone can produce asthma-like symptoms. Balb/c mice received a single intratracheal instillation of particulate matter and TiO<sub>2</sub> or they were exposed to low concentration of ozone. We have established that exposure to particulate matter produces increased responsiveness to methacholine in mice. Exposure to ozone and TiO<sub>2</sub> did not produce changes in respiratory mechanics. These data are spreading our understanding about mechanisms of environmental influence on airways.

*P.L. Shupik Medical Academy for Postgraduate Training, Kiev*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Додина Л.Г. К проблеме влияния атмосферных загрязнений на состояние здоровья населения. —

- Гигиена и санитария. – 1999. - № 3. – С. 9-10.
2. Зеркаль Л.И., Беднарик О.Н., Павленко М.Е. Загрязнители атмосферного воздуха и показатели смертности населения // Лікар. справа. – 1994. - № 9-12. – С. 190-192.
  3. Сабирова З.Ф. Роль загрязнений атмосферного воздуха в формировании аллергической патологии у детей // Гигиена и санитария. – 1999. - № 6. – С. 50-51.
  4. Соколюк Н.Л. Стан повітряного середовища та гіперчутливість бронхів // Лікар. справа. – 1996. - № 5-6. – С. 78-79.
  5. Нечитайло Ю.М. Екологічний стан повітря та частота гострих респіраторних вірусних інфекцій у дітей // Інфек. хвороби. – 1998. - № 4. – С. 35-37.
  6. Aris R.M., Christian D., Hearne P.Q. et al. Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy// Amer. Rev. Respir. Dis. – 1993. – **148**. – P. 1363-1372.
  7. Bascom R. Environmental factors and respiratory hypersensitivity: the Americas// Toxicol Letters. – 1996. – **86**. – P. 115-130.
  8. Boushey H.A., Holtzman M.J. Experimental airway inflammation and hyperreactivity. Searching for cells and mediators// Amer. Rev. Respir. Dis. – 1985. – **131**. – P. 312-313.
  9. Empey D.W., Laitinen L.A., Jakobes L. et al. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after respiratory tract infection// Ibid. – 1976. – **113**. – P. 131-139.
  10. Hortsman D.H., Folinsbee L.J., Ives P.J. et al. Ozone concentration and pulmonary response relationships for 6.6- hour exposures with 5 hours of moderate exercise to 0.08, 0.10 and 0.12 ppm// Ibid. – 1990. – **142**. – P. 1158-1163.
  11. Kirichenko A., Li L., Morandi M.T. 4- Hydroxy-2-nonenal- Protein Adducts and Apoptosis in Murine Lung Cells after Acute Ozone Exposure // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1996. – **141**. – P. 416-424.
  12. Kleeberger S.R., Basset D.J., Jakab G.J. et. al. A genetic model for evaluation of susceptibility to ozone-induced inflammation // Amer. J. Physiol. – 1990. – **258**. – P. 313-320.
  13. Larsen G.L., Colasurdo G.N. Animal models of asthma. In: The Lung : Scientific Foundation. – New York.: Raven Press., 1997. – P. 1315-1331.
  14. Linn W.S., Venet T.G., Shamoo D.A. Respiratory effects of sulfur dioxide in heavily exercising asthmatics: a dose-response study// Amer. Rev. Respir. Dis. – 1983. – **127**. – P. 278-283.
  15. Molfino N.A., Wright S.C., Satz I. Effect of low concentration of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects// Lancet. – 1991. – **338**. – P. 199-203.
  16. Ostro B.D., Eskeland G.S., Sanchez J.M. et al. Air pollution and health effects: A study of medical visits among children in Santiago, Chile// Environ Health Perspect. – 1999. – **107**. – P. 69-73.
  17. Peters J.M., Avol E., Gauderman W.J. et al. A study of twelve Southern California communities with different levels and types of air pollution. Effects on pulmonary function// Amer. J. Respir. Crit. Care Med. – 1999. – **159**. – P. 768-775.
  18. Pope C.A., Dockery D.W. Acute health effects of PM 10 pollution on symptomatic and asymptomatic children // Amer. Rev. Respir. Dis. – 1992. – **145**. – P. 1123-1128
  19. Schwartz J.D.W., Dockery L.M., Neas D. et al. Acute effects of summer air pollution of respiratory symptom reporting in children // Amer. J. Respir. Crit. Care Med. – 1994. – **5**. – P. 1234-1242.
  20. Seltzer J., Bigby B.G., Stulbarg M. et al. O<sub>3</sub>- induced change in bronchial reactivity to methacholine and airway inflammation in humans // J. Appl. Physiol. – 1986. – **60**. – P. 1321-1326.
  21. Yanai M., Ohrai T., Aikawa T. Ozone increases susceptibility to antigen inhalation in allergic dogs// Ibid. – 1990. – **68**. – P. 2267-2273.
  22. Zhang Y., Lamm W.J., Albert R.K. et. al. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response // Amer. J. Respir. Crit. Care Med.- 1997. – **155**. – P. 661-669.

Київ. мед. акад. післядиплом. освіти  
ім. П.Л. Шупика

Матеріал надійшов до  
редакції 11.01.2001