

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma634392>

УДК 612.25 + 615.099.092



Динамика содержания водных каналов аэрогематического барьера в скрытом периоде токсического отека легких

Д.Т. Сизова¹, П.Г. Толкач¹, А.А. Бардин², В.Н. Бабаков^{2, 4}, Н.Г. Венгерович³,
С.В. Чепур³, В.А. Башарин¹

¹ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;

² Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека, г. п. Кузьмолосовское, Россия;

³ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Оценивается динамика содержания водных каналов аэрогематического барьера (аквапорин 1, аквапорин 5, эпителиальный натриевый канал) в скрытом периоде интоксикации крыс карбонилхлоридом, продуктами термодеструкции фторопласта, содержащими перфторизобутилен, и диоксидом азота. Моделировали интоксикацию крыс карбонилхлоридом, продуктами термодеструкции фторопласта, содержащими перфторизобутилен, и диоксидом азота в средних летальных концентрациях. Через 30 и 60 мин после воздействия определяли легочный коэффициент, выполняли гистологическое и иммуногистохимическое исследования. При проведении вестерн-блот-анализа определяли содержание аквапорина 5 в тканях легких крыс, подвергшихся воздействию продуктов термодеструкции фторопласта. Установлено, что интоксикация крыс карбонилхлоридом и продуктами термодеструкции фторопласта, содержащими перфторизобутилен, способствует увеличению относительного содержания аквапорин 5- и эпителиальных натриевых каналов позитивных клеток в тканях легких уже через 30 мин после воздействия. Через 60 мин после воздействия наблюдаются признаки интерстициальной фазы токсического отека легких и увеличение легочного коэффициента. Через 30 мин после воздействия диоксида азота определяется увеличение легочного коэффициента, выраженные признаки интерстициальной фазы отека и увеличение относительного содержания аквапорин 5-позитивных клеток. При проведении вестерн-блот-анализа с использованием анти-аквапорин 5-антител определяется увеличение интенсивности окрашивания комплексов с молекулярной массой 25 и 50 кДа, что может свидетельствовать об образовании тетрамера аквапорина 5 и, вероятно, его транслокации из внутриклеточного компартмента на плазматическую мембрану альвеолоцитов. Таким образом, аквапорин 5 играет важную роль в патогенезе токсического отека легких, вызванного воздействием исследуемых пульмоноотоксикантов. Таргетное воздействие на данный канал может быть перспективным подходом в проведении патогенетической терапии отравлений.

Ключевые слова: аквапорин 1; аквапорин 5; диоксид азота; иммуногистохимия; интоксикация; карбонилхлорид; перфторизобутилен; токсический отек легких; эпителиальный натриевый канал.

Как цитировать

Сизова Д.Т., Толкач П.Г., Бардин А.А., Бабаков В.Н., Венгерович Н.Г., Чепур С.В., Башарин В.А. Динамика содержания водных каналов аэрогематического барьера в скрытом периоде токсического отека легких // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2024. Т. 26, № 4. С. 541–550. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma634392>

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma634392>

Dynamics of aquaporin content in the aero-hematic barrier during the latent phase of toxic pulmonary edema

D.T. Sizova¹, P.G. Tolkach¹, A.A. Bardin², V.N. Babakov^{2, 4}, N.G. Vengerovich³, S.V. Chepur³, V.A. Basharin¹

¹ Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;

² Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Kuzmolovskoye, Russia;

³ State Research and Testing Institute of Military Medicine, Saint Petersburg, Russia;

⁴ Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

The study evaluates the dynamics of aquaporin (aquaporin-1, aquaporin-5, and epithelial sodium channel) content in the aero-hematic barrier during the latent phase of rat intoxication with carbonyl chloride (phosgene), thermal decomposition products of fluoroplast containing perfluoroisobutylene, and nitrogen dioxide. Rat intoxication was modeled using average lethal concentrations of these toxic substances. At 30 and 60 minutes post-exposure, pulmonary coefficient was measured and histological and immunohistochemical studies were performed. Western blot analysis was used to determine the aquaporin-5 content in rat lung tissues exposed to the thermal decomposition products of fluoroplast. It was found that rat intoxication with phosgene and thermal decomposition products of fluoroplast containing perfluoroisobutylene led to an increase in the relative content of aquaporin-5 and epithelial sodium channel-positive cells in lung tissues as early as 30 minutes post-exposure. At 60 minutes post-exposure, there were signs of the interstitial phase of toxic pulmonary edema and an increase in the pulmonary coefficient. Exposure to nitrogen dioxide resulted in an increase in the pulmonary coefficient and the relative content of aquaporin-5-positive cells, as well as pronounced signs of the interstitial phase of edema 30 minutes post-exposure. Western blot analysis using anti-aquaporin-5 antibodies revealed an increase in the staining intensity of complexes with molecular weights of 25 and 50 kDa, suggesting the formation of aquaporin-5 tetramers and their likely translocation from the intracellular compartment to the plasma membrane of alveolar cells. These findings indicate that aquaporin-5 plays an important role in the pathogenesis of toxic pulmonary edema induced by the studied pneumotoxicants. Targeting these molecules may be a promising approach for pathogenetic therapy of poisoning.

Keywords: aquaporin-1; aquaporin-5; nitrogen dioxide; immunohistochemistry; intoxication; carbonyl chloride (phosgene); perfluoroisobutylene; toxic pulmonary edema; epithelial sodium channel.

To cite this article

Sizova DT, Tolkach PG, Bardin AA, Babakov VN, Vengerovich NG, Chepur SV, Basharin VA. Dynamics of aquaporin content in the aero-hematic barrier during the latent phase of toxic pulmonary edema. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2024;26(4):541–550. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma634392>

Received: 17.07.2024

Accepted: 01.10.2024

Published: 19.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma634392>

中毒性肺水肿潜伏期气血屏障水通道含量的动态变化

D.T. Sizova¹, P.G. Tolkach¹, A.A. Bardin², V.N. Babakov^{2, 4}, N.G. Vengerovich³, S.V. Chepur³, V.A. Basharin¹¹ Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;² Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Kuzmolovskoye, Russia;³ State Research and Testing Institute of Military Medicine, Saint Petersburg, Russia;⁴ Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

摘要

评估老鼠在羰基氯、含全氟异丁烯的氟塑料热降解产物和二氧化氮中毒潜伏期气血屏障水通道成分（水通道蛋白-1、水通道蛋白-5、上皮钠通道）的动态变化。在中等致死浓度下，模拟了老鼠对羰基氯、含全氟异丁烯的氟塑料热降解产物和二氧化氮的中毒情况。接触后30分钟和60分钟，测定肺系数，并进行组织学和免疫组织化学研究。通过蛋白质印迹分析测定了接触氟塑料热降解产物的老鼠肺组织中的水通道蛋白-5的含量。已确定，中毒于羰基氯和含全氟异丁烯的氟塑料的热降解产物的老鼠，接触后30分钟肺组织中水通道蛋白-5和上皮钠通道阳性细胞的相对含量增加。接触后60分钟，观察到中毒性肺水肿间质期迹象和肺系数增加。二氧化氮接触后30分钟，测定肺系数增加、水肿间质期的迹象明显和水通道蛋白-5阳性细胞的相对含量增加。使用抗水通道蛋白-5抗体进行蛋白质印迹分析时，发现分子量为25和50kDa的复合物染色强度增加，这可能证明水通道蛋白-5四聚体的形成，或许其是从细胞内转移至肺泡细胞质膜。由此可见，在因肺毒性物质接触测试而导致的中毒性肺水肿的发病机制中，水通道蛋白-5发挥着重要作用。对该通道的靶向作用可能是一种很有前景的中毒病理治疗方法。

关键词：水通道蛋白-1；水通道蛋白-5；二氧化氮；免疫组织化学；中毒；羰基氯；全氟异丁烯；中毒性肺水肿；上皮钠通道。

引用本文

Sizova DT, Tolkach PG, Bardin AA, Babakov VN, Vengerovich NG, Chepur SV, Basharin VA. 中毒性肺水肿潜伏期气血屏障水通道含量的动态变化. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2024;26(4):541–550. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma634392>

收稿：17.07.2024

录用：01.10.2024

发表：19.12.2024

ВВЕДЕНИЕ

Водные каналы аэрогематического барьера (аквапорин (aquaporin — AQP) 1, аквапорин 5, эпителиальный натриевый канал (ENaC)) играют важную роль в физиологическом транспорте жидкости через аэрогематический барьер. Вместе с тем роль данных каналов в патогенезе токсического отека легких, вызванном воздействием классических пульмонотоксикантов, в доступной литературе не описана.

Спектр веществ, обладающих пульмонотоксическим действием, весьма разнообразен. Среди классических пульмонотоксикантов выделяют вещества, которые, поступая в организм ингаляционно, приводят к нарушению структуры и функции дыхательной системы. По механизму действия пульмонотоксиканты можно подразделить на ацилирующие агенты (карбонилхлорид, перфторизобутилен) и вещества, инициирующие коагуляцию белка и процессы свободнорадикального окисления в компонентах аэрогематического барьера, например диоксид азота. Интоксикация ацилирующими агентами может произойти при возникновении аварий на химически опасных объектах, горении фторопластов на пожаре, применении химического оружия. Диоксид азота — один из компонентов пороховых и взрывных газов, воздействие которого на организм может происходить при стрельбе в плохо вентилируемых помещениях и срабатывании боеприпасов [1–4].

Интоксикация пульмонотоксикантами приводит к формированию токсического отека легких. Процессы, происходящие в период основных проявлений интоксикации, хорошо изучены, в свою очередь, данные о патогенетических каскадах, реализующихся в скрытом периоде интоксикации, весьма скудны.

На сегодняшний день подходы к фармакологической коррекции токсического отека легких достаточно ограничены. Это может быть связано с неполным пониманием первичных механизмов его формирования, особенно при интоксикации ацилирующими агентами [1, 3, 5]. Перемещение воды из системного кровотока в ткани легких может осуществляться парацеллюлярно и трансцеллюлярно посредством водных каналов аэрогематического барьера [6]. Трансцеллюлярный транспорт через эндотелиоциты опосредован активацией AQP-1, через альвеолоциты 1-го типа — AQP-5 [6, 7]. Трансцеллюлярное перемещение воды из альвеолярного пространства в интерстиций (альвеолярный клиренс) происходит через амилорид-чувствительные эпителиальные натриевые каналы [8]. Водные каналы аэрогематического барьера играют ведущую роль в поддержании водного баланса в легких, помимо этого они могут участвовать в патологических перемещениях воды, например, при формировании токсического отека легких [5, 9]. При нарушении целостности аэрогематического барьера, вызванного воздействием разъедающих веществ (прижигающие кислоты

и щелочи), воспалительным процессом или активацией реакций свободнорадикального окисления, функционирование водных каналов нарушается [10, 11].

Данные литературы о роли водных каналов аэрогематического барьера в патогенезе токсического отека легких противоречивы. В исследовании В. Hasan и соавт. [12] было продемонстрировано, что экспрессия AQP-5 была значительно снижена через 12 и 24 ч после моделирования токсического отека легких, вызванного интоксикацией липополисахаридом. В исследовании А. Ohinata и соавт. [10] выявлено, что воздействие на клеточную линию легочных эпителиальных клеток мышей липополисахаридом приводило к увеличению содержания AQP-5 на плазматической мембране клеток через 0,5–2 ч после воздействия и увеличению осмотической водной проницаемости через плазматическую мембрану. Таким образом, данные литературы о роли аквапоринов в формировании токсического отека легких неоднозначны. Экспериментальные данные о роли аквапоринов и ENaC в формировании токсического отека легких, вызванном воздействием классических пульмонотоксикантов (карбонилхлорид, перфторизобутилен, диоксид азота), в доступной литературе не найдены.

Цель исследования — оценить динамику содержания водных каналов аэрогематического барьера (AQP-1, AQP-5, ENaC) в скрытом периоде интоксикации крыс карбонилхлоридом, продуктами термодеструкции фторопласта, содержащими перфторизобутилен, и диоксидом азота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 54 крысах-самцах, разделенных на 4 группы по 6 особей в каждой: контрольную (КГ), перфторизобутилена (ПФИБ), карбонилхлорида (СОСl₂) и диоксида азота (NO₂). Животные КГ во время пребывания в ингаляционной камере дышали атмосферным воздухом в течение 15 мин. Животных группы ПФИБ подвергали статической ингаляционной интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта (концентрация соответствовала средней летальной (HLC₅₀)), содержащими перфторизобутилен. Животных группы СОСl₂ подвергали статической ингаляционной интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта (концентрация, соответствующей средней летальной (LC₅₀)). Животных группы NO₂ подвергали статической ингаляционной интоксикации диоксидом азота, полученным химическим путем, в концентрации, соответствующей LC₅₀. Во всех экспериментах экспозиция составила 15 мин. При проведении иммуногистохимического исследования для каждой группы животных, подвергшихся интоксикации, формировали отдельную КГ (КГ-1, КГ-2, КГ-3).

Содержание перфторизобутилена в составе газозооной смеси определяли путем газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим

детектированием с помощью хроматографа «Agilent 7890B» с масс-селективным детектором «Agilent 240 ms» фирмы «Agilent 7890B» (Соединенные Штаты Америки — США). Концентрацию карбонилхлорида и диоксида азота в ингаляционной камере определяли при помощи газоанализатора «PortaSens II» фирмы «ATI» (США).

Животных выводили из эксперимента через 30 и 60 мин после воздействия, используя раствор тилетамина + золазепам (в соответствующих дозировках). Извлекали легкие, определяли легочной коэффициент. Для оценки патологических изменений в тканях легких выполняли гистологическое исследование. Ленточные срезы легких выполняли на санном микротоме «PFM Slide 2003» фирмы «PFM Medical GmbH» (Германия), полученные микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином, микроскопическое исследование проводили, используя микроскоп «Leica DM2000» фирмы «Leica Microsystems» (Германия), осуществляли фоторегистрацию.

Для выполнения иммуногистохимического исследования из предварительно приготовленных парафиновых блоков при помощи ротационного микротомы изготавливали срезы ткани легких толщиной 4 мкм, которые размещали на предметных стеклах, обработанных полилизинном. После высокотемпературной обработки срезов (98 °С, 20 мин в цитратном буфере с pH 6) выполняли иммуногистохимическое окрашивание с использованием кроличьих поликлональных анти-AQP₅-антител (в разведении 1:400) фирмы «Affinity Biosciences LTD» (Китай), анти- α 1-ENaC антител (1:400 фирмы «Atagenix Laboratories» (Китай) и анти-AQP₁-антител (1:400 фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай)). Иммуногистохимическое окрашивание выполняли при помощи универсальной системы визуализации «UltraVisionQuanto» фирмы «Thermo» (США) и автоматического иммуностейнера «Autostainer A360» фирмы «Thermo» (США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для реализации сэндвич-метода формирования иммунных комплексов выявляли мечеными пероксидазой вторыми антителами к кроличьим иммуноглобулинам. В качестве оптически плотной метки использовали диаминобензидин.

Для количественного определения на иммуногистохимических препаратах комплексов AQP-5-антитело, AQP-1-антитело и ENaC-антитело использовали методику гистологического счета H-score [13]. Относительное содержание исследуемых комплексов оценивали путем подсчета позитивных клеток в поле зрения при увеличении объектива $\times 100$ при подсчете не менее 10 полей зрения.

Пробоподготовку тканей легких для проведения вестерн-блот-анализа выполняли по стандартной методике. После проведения электрофореза в полиакриламидном геле выполняли полусухой электроперенос белков из геля на поливинилиденфторидную мембрану фирмы «Trans-Blot Turbo Midi PVDF, Bio-Rad» (США). Мембрану

последовательно инкубировали в буфере «iBind» фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США) с кроличьими поликлональными антителами к AQP-5 (1:2000) фирмы «Affinity Biosciences LTD» (Китай) и антителами к антителам кролика, мечеными пероксидазой (1:10 000) фирмы «Sigma» (США). Визуализацию полос белка проводили с использованием системы хемиллюминесценции «Clarity Western ECL» фирмы «Bio-Rad» (США) с геле-документирующей системой «ChemIDoc MP» фирмы «Bio-Rad» (США). Определяли интенсивность окрашивания в зонах с молекулярной массой от 25 до 75 кДа.

Полученные экспериментальные данные выражали в виде медианы, первого и третьего квартилей ($Me [Q_1; Q_3]$). Для сравнения двух и более независимых групп использовали критерий Краскела – Уолиса и критерий Ньюмана – Кейлса для выполнения множественных попарных сравнений. О значимости различий между группами судили при уровне $p < 0,05$.

Проведение экспериментального исследования одобрено локальным независимым этическим комитетом Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (протокол № 288 от 20.02.2024). При проведении исследований соблюдали требования нормативно-правовых актов по работе с лабораторными животными, в том числе по гуманному отношению к ним.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 1-го часа после воздействия исследуемых пульмонотоксикантов внешних проявлений интоксикации у крыс не выявлено. При проведении гистологического исследования легких у крыс, подвергшихся воздействию ацилирующих агентов (группа ПФИБ и СОС_l), только на 60 мин постинтоксикационного периода выявлялись начальные признаки интерстициальной фазы токсического отека легких и увеличивался легочный коэффициент. В свою очередь, у крыс группы NO₂ интоксикация диоксидом азота приводила к значимому увеличению легочного коэффициента уже через 30 мин после воздействия и появлению выраженных признаков интерстициальной фазы отека (рис. 1).

В целом динамика легочного коэффициента соответствовала изменениям в тканях легких крыс, выявленным при проведении гистологического исследования. Так, через 30 мин после воздействия карбонилхлорида (группа СОС_l) и продуктов термодеструкции фторопласта (группа ПФИБ) определялась нормальная гистоархитектоника тканей легких. Через 60 мин после воздействия наблюдалось утолщение межальвеолярных перегородок, стаз эритроцитов в сосудах, появление в просвете альвеол единичных нитей, предположительно фибрина. В свою очередь, уже через 30 мин после воздействия диоксида азота в тканях легких крыс (группа NO₂) наблюдалось утолщение межальвеолярных перегородок, их пропитывание эритроцитами и нейтрофилами, полнокровие

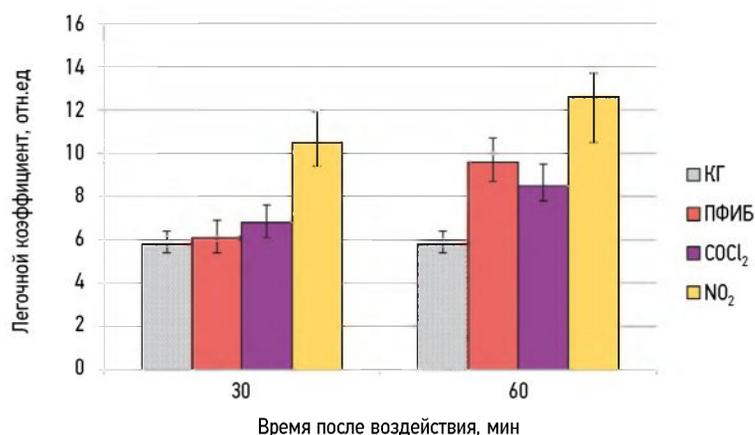


Рис. 1. Динамика легочного коэффициента крыс в различные сроки после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта
Fig. 1. Dynamics of the pulmonary coefficient in rats exposed to thermal decomposition products of fluoroplast at different times

сосудов, умеренное количество гомогенного содержимого в просвете альвеол (рис. 2).

При проведении иммуногистохимического исследования наблюдалось значимое ($p < 0,05$) увеличение содержания AQP-5-позитивных клеток через 30 и 60 мин после воздействия исследуемых токсикантов по сравнению с КГ-1, КГ-2 и КГ-3. Наибольшее увеличение содержания AQP-5-позитивных клеток и накопление внесосудистой жидкости определялось в тканях легких крыс группы ПФИБ, полученных через 60 мин после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта (рис. 3, 4).

При этом изменений легочного коэффициента у крыс через 30 мин после воздействия ацилирующих агентов выявлено не было. Это может быть связано с усилением альвеолярного клиренса через ENaC, значимое увеличение которых на альвеолоцитах прослеживали уже через 30 мин после воздействия. Так, Y. Berthiaume и соавт. [5] на моделях повреждения легких, сопровождающихся накоплением жидкости в альвеолярном пространстве, показали, что усиление альвеолярного клиренса происходит за счет увеличения содержания ENaC в альвеолоцитах.

Известно, что перемещение воды из интерстиция в альвеолярное пространство парацеллюлярным путем не происходит из-за барьерной функции аэрогематического барьера [14], соответственно, при сохраненном барьере транспорт воды в альвеолярное пространство может происходить только через AQP-5. Однако в проведенном ранее электронно-микроскопическом исследовании в скрытом периоде токсического отека легких, вызванного воздействием на крыс перфторизобутиленом, выявили расширение межклеточных пространств в эпителии, спрямление контактирующих торцевых клеточных поверхностей, оголение базальной мембраны при отслоении отростков клеток и дистрофически измененные альвеолоциты [15]. Таким образом, нарастание легочного коэффициента и появление отечной жидкости в альвеолах

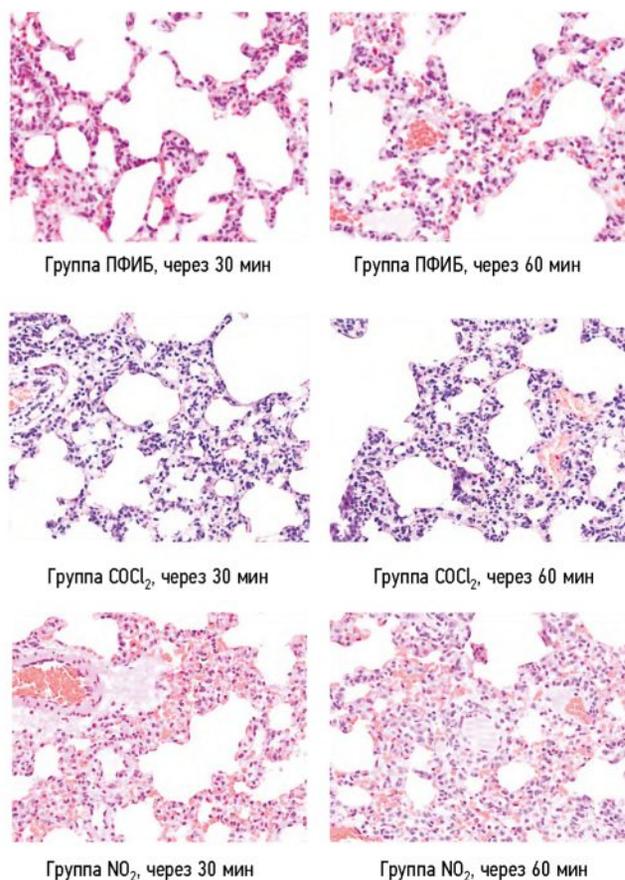


Рис. 2. Динамика отека интерстиция легких крыс групп ПФИБ, СОСІ₂ и NO₂ в различные сроки после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта. Окраска гематоксилином и эозином, ув. об. ×50

Fig. 2. Dynamics of pulmonary interstitial edema in rats from the perfluoroisobutylene, COCl₂, and NO₂ groups exposed to thermal decomposition products of fluoroplast at different times. Hematoxylin/eosin staining; magnification: ×50 ocular

с выпадением фибрина через 1 ч после воздействия ацилирующих агентов, по-видимому, было связано в первую очередь с увеличением трансцеллюлярного перемещения воды через AQP-5.

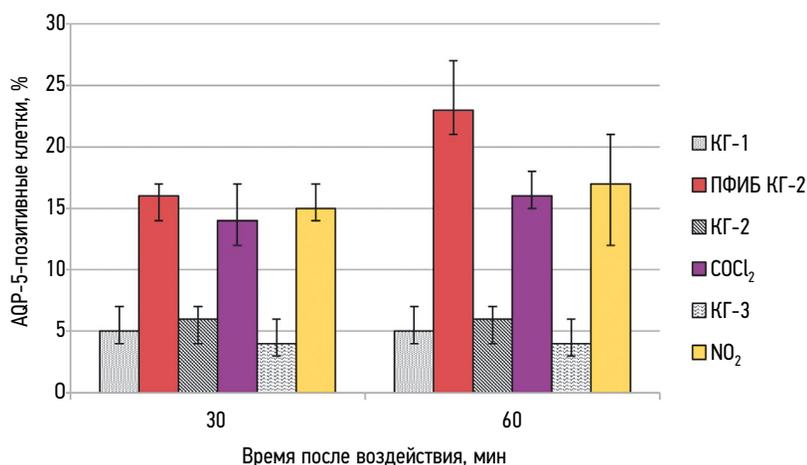


Рис. 3. Содержание AQP-5-позитивных клеток в легких крыс групп ПФИБ, СОСl₂ и NO₂ в различные сроки после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта

Fig. 3. Lung content of aquaporin-5-positive cells in rats from the perfluoroisobutylene, COCl₂, and NO₂ groups exposed to thermal decomposition products of fluoroplast at different times

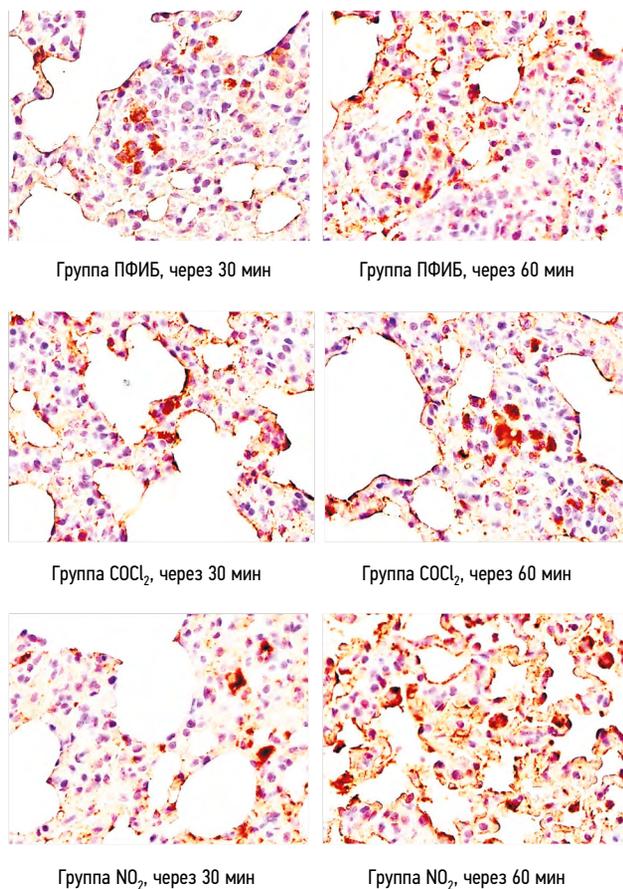


Рис. 4. Накопление AQP-5-ассоциированных иммунных комплексов с пероксидазой, окрашенных диаминобензидином, в тканях легких крыс групп ПФИБ, СОСl₂ и NO₂ в различные сроки после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта, ув. об. ×100

Fig. 4. Accumulation of aquaporin-5-associated immune complexes with peroxidase stained with diaminobenzidine in lung tissues of rats from the perfluoroisobutylene, COCl₂, and NO₂ groups exposed to thermal decomposition products of fluoroplast at different times. Magnification: ×100 ocular

У животных, подвергшихся воздействию диоксида азота, увеличение относительного содержания AQP-5-позитивных клеток было сопряжено с нарастанием легочного коэффициента уже через 30 мин после воздействия. Учитывая, что диоксид азота в тканях легких инициирует коагуляцию белка и формирование ответной воспалительной реакции с активацией свободнорадикального окисления [16], его воздействие опосредует нарушение целостности альвеолярного барьера. Вероятно, нарастание легочного коэффициента уже через 30 мин после воздействия было связано как с проникновением воды в альвеолярное пространство через AQP-5, так и парацеллюлярно, через разрушенные межклеточные контакты.

Значимых изменений содержания AQP-1-позитивных клеток в тканях легких крыс через 30 и 60 мин после воздействия исследуемых токсикантов по сравнению с КГ-1, КГ-2 и КГ-3 не выявлено (рис. 5). По-видимому, патологическое перемещение жидкости из системного кровотока, прослеживаемое на гистологических препаратах в виде отека и набухания межальвеолярных перегородок, при интоксикации исследуемыми пульмонотоксикантами происходило преимущественно за счет парацеллюлярного транспорта или канал-независимыми путями (пиноцитоз — экзоцитоз, фенестрация отростков эндотелиоцитов).

В тканях легких крыс, полученных через 60 мин после воздействия карбонилхлорида (группа СОСl₂) и продуктов термодеструкции фторопласта (группа ПФИБ), определялось значимое ($p < 0,05$) увеличение содержания ENaC-позитивных клеток по сравнению с КГ-1 и КГ-2, тогда как при воздействии диоксида азота (группа NO₂) увеличения плотности этих каналов по сравнению с КГ-3 не выявлено (рис. 6).

В связи с тем, что наибольшее увеличение содержания AQP-5-позитивных клеток в течение 1-го часа

интоксикации наблюдалось у крыс группы ПФИБ, вестерн-блот-исследование, в виде отдельной серии экспериментов для определения относительного содержания AQP-5 через 30 и 60 мин после воздействия продуктов термодеструкции, решено провести на животных этой группы.

Установлено, что у животных КГ после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта наблюдалось интенсивное окрашивание в зоне с молекулярной массой 25 и 50 кДа. Через 30 мин после воздействия у крыс группы ПФИБ происходило визуально наблюдаемое расширение полосы окрашивания в зоне с молекулярной массой 25 и 50 кДа, но уже через 60 мин у них определялось снижение интенсивности окрашивания в зоне с молекулярной массой 25 кДа при сохранении интенсивности окрашивания в зоне с молекулярной массой 50 кДа по сравнению с КГ (рис. 7).

Заметим, что молекулярная масса одной субъединицы AQP-5 составляет около 28 кДа. Каждая субъединица AQP-5 может функционировать самостоятельно, но при сборке в тетрамер стабильность комплекса увеличивается [17, 18]. Результаты проведенного

вестерн-блот-исследования свидетельствуют о том, что AQP-5 в клетках существует в полимерной субъединичной форме.

Известно, что димерные формы аквапоринов более устойчивы к денатурации, чем тетрамерные. Так, в работе J.G. Sorbo и соавт. [19] было продемонстрировано, что воздействие целого ряда детергентов (в том числе используемых при проведении пробоподготовки в вестерн-блот анализе) на AQP-4 приводило к его переходу в форму димера. Таким образом, можно предположить, что димеры AQP-5 являются продуктом неполной диссоциации тетрамерной формы при денатурирующей пробоподготовке при проведении иммуноблотинга.

По данным J. Alam и соавт. [20], AQP-5, находящийся в цитоплазме клетки в ответ на изменение концентрации внутриклеточного кальция, перемещается из внутриклеточного компартмента на апикальную поверхность плазматической мембраны альвеолоцитов 1-го типа. Вопрос о том, играет ли роль транслокация AQP-5 из субклеточного компартмента на поверхность плазматической мембраны при формировании токсического отека легких,

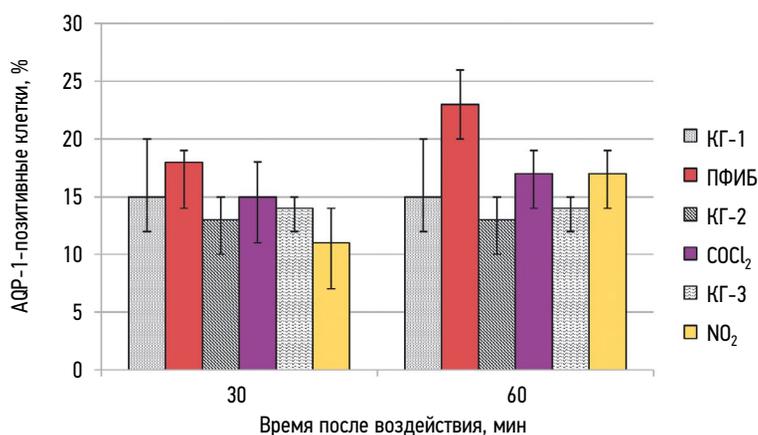


Рис. 5. Содержание AQP-1-позитивных клеток в тканях легких крыс групп ПФИБ, СОСІ₂ и NO₂ в различные сроки после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта

Fig. 5. Lung content of aquaporin-1-positive cells in rats from the perfluoroisobutylene, COCl₂, and NO₂ groups exposed to thermal decomposition products of fluoroplast at different times

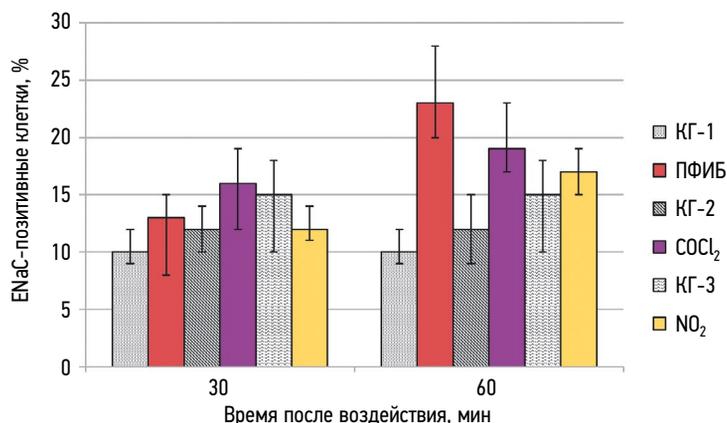


Рис. 6. Содержание ENaC-позитивных клеток в легких крыс групп ПФИБ, СОСІ₂ и NO₂ в различные сроки после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта

Fig. 6. Lung content of ENaC-positive cells in rats from the perfluoroisobutylene, COCl₂, and NO₂ groups exposed to thermal decomposition products of fluoroplast at different times

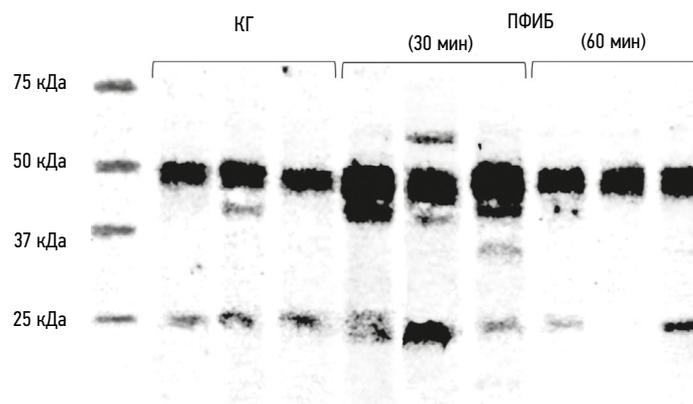


Рис. 7. Вестерн-блот-анализ содержания AQP-5 в гомогенатах тканей легких крыс группы ПФИБ, полученных через 30 и 60 мин после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта

Fig. 7. Western blot analysis of aquaporin-5 content in homogenized lung tissues of rats from the perfluoroisobutylene group obtained 30 and 60 minutes post-exposure to thermal decomposition products of fluoroplast

остается открытым [10]. При проведении нами вестерн-блот-анализа было показано, что интоксикация животных приводит к усилению интенсивности окрашивания в зоне с молекулярной массой 50 кДа. По-видимому, в ответ на воздействие продуктов термодеструкции фторопласта, содержащих перфторизобутилен, происходит объединение субъединиц AQP-5. Повышенное содержание димера, выявленное с помощью иммуноблотинга, косвенно свидетельствует о накоплении тетрамера AQP-5 *in vivo* в ответ на воздействие токсиканта, и, вероятно, его перемещение на плазматическую мембрану приводит к увеличению патологического транспорта жидкости и накоплению внесосудистой воды в легких с манифестацией патологического процесса.

Ограничение исследования обусловлено методологией проводимого иммуногистохимического исследования. С учетом возможностей методики выполнена только оценка содержания водных каналов аэрогематического барьера и количества экспрессирующих их клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогрессирование патогенетических процессов в тканях легких в ответ на воздействие ацилирующих агентов и диоксида азота происходит уже в скрытом периоде интоксикации (30 мин после воздействия). Данные изменения связаны с нарастанием содержания AQP-5, по-видимому, обусловленным сборкой димеров белка в тетрамер, и, как следствие этого, увеличением водной проницаемости. Таргетное воздействие на AQP-5 может быть перспективным подходом для коррекции токсического отека легких, вызванного воздействием пульмонотоксикантов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования

и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Вклад каждого автора. Д.Т. Сизова — дизайн исследования, анализ данных, написание статьи; П.Г. Толкач — анализ данных; А.А. Бардин — выполнение экспериментальных исследований; В.Н. Бабаков — выполнение экспериментальных исследований; Н.Г. Венгерович — анализ данных; С.В. Чепур — разработка общей концепции, анализ данных; В.А. Башарин — дизайн исследования, анализ данных.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

The contribution of each author. D.T. Sizova — research design, data analysis, writing an article; P.G. Tolkach — data analysis; A.A. Bardin — experimental research; V.N. Babakov — experimental research; N.G. Vengerovich — data analysis; S.V. Chepur — development of a general concept, data analysis; V.A. Basharin — research design, data analysis.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башарин В.А., Чепур С.В., Щеголев А.В., и др. Роль и место респираторной поддержки в схемах терапии острого легочного отека, вызванного ингаляционным воздействием токсичных веществ // Военно-медицинский журнал. 2019. Т. 340, № 11. С. 26–32. EDN: JPJONV
2. Шаповалов И.Д., Ярошенко Д.М., Толкач П.Г., и др. Экспериментальная оценка эффективности применения кислорода и преднизолона для коррекции токсического отека легких, вызванного интоксикацией продуктами термодеструкции нитроцеллюлозы // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. 2024. Т. 25, № 1. С. 205–219. EDN: BWCVDB
3. Patocka J. Perfluoroisobutene: poisonous choking gas // *Mil Med Sci Lett*. 2019. Vol. 88, N 3. P. 98–105. doi: 10.31482/mmsl.2019.006
4. Jugg B.J. Toxicology and treatment of phosgene induced lung injury // *Chemical warfare toxicology. Fundamental aspects*. Edition: 1. Chapter: 4. Publisher: RSC, Worek F., Jener J., Thiermann H., eds. 2016. Vol. 1. P. 117–153. doi: 10.1039/9781782622413-00117
5. Berthiaume Y., Folkesson H.G., Matthay M.A. Lung edema clearance: 20 years of progress: invited review: alveolar edema fluid clearance in the injured lung // *J Appl Physiol* (1985). 2002. Vol. 93, N 6. P. 2207–2213. doi: 10.1152/jappphysiol.01201.2001
6. Skowronska A., Tanski D., Jaskiewicz L., Skowronski M.T. Modulation by steroid hormones and other factors on the expression of aquaporin-1 and aquaporin-5 // *Vitam Horm*. 2020. Vol. 112. P. 209–242. doi: 10.1016/bs.vh.2019.08.006
7. Zeuthen T. General models for water transport across leaky epithelia // *Int Rev Cytol*. 2002. Vol. 215. P. 285–317. doi: 10.1016/s0074-7696(02)15013-3
8. Berthiaume Y., Matthay M.A. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury // *Respir Physiol Neurobiol*. 2007. Vol. 159, N 3. P. 350–359. doi: 10.1016/j.resp.2007.05.010
9. King L.S., Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels // *Annu Rev Physiol*. 1996. Vol. 58. P. 619–648. doi: 10.1146/annurev.ph.58.030196.003155
10. Ohinata A., Nagai K., Nomura J., et al. Lipopolysaccharide changes the subcellular distribution of aquaporin 5 and increases plasma membrane water permeability in mouse lung epithelial cells // *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. Vol. 326, N 3. P. 521–526. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.216
11. Sugita M., Ferraro P., Dagenais A., Clermont M.E., et al. Alveolar liquid clearance and sodium channel expression are decreased in transplanted canine lungs // *Am J Respir Crit Care Med*. 2003. Vol. 167, N 10. P. 1440–1450. doi: 10.1164/rccm.200204-3120C
12. Hasan B., Li F.S., Siyit A., et al. Expression of aquaporins in the lungs of mice with acute injury caused by LPS treatment // *Respir Physiol Neurobiol*. 2014. Vol. 200. P. 40–45. doi: 10.1016/j.resp.2014.05.008
13. Ishibashi H., Suzuki S., Moriya T., Kaneko Ch., et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma // *J Clin Endocrinol Metab*. 2003. Vol. 88, N 5. P. 2309–2317. doi: 10.1210/jc.2002-021353
14. Cai-Zhi S., Hua Sh., Xiao-Wei H., et al. Effect of dobutamine on lung aquaporin 5 in endotoxine shockinduced acute lung injury rabbit // *J Thorac Dis*. 2015. Vol. 7, N 8. P. 1467–1477. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.08.22
15. Толкач П.Г., Башарин В.А., Чепур С.В., и др. Ультраструктурные изменения аэрогематического барьера крыс при острой интоксикации продуктами пиролиза фторопласта // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 169, № 2. С. 235–241. EDN: USZBXQ doi: 10.1007/s10517-020-04866-x
16. Тиунов Л.А., Головенко Н.Я., Галкин Б.Н., Баринов В.А. Биохимические механизмы токсичности оксидов азота // Успехи современной биологии. 1991. Т. 111, № 5. С. 738–750.
17. Agre P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture) // *Angew Chem Int Ed*. 2004. Vol. 43, N 33. P. 4278–4290. doi: 10.1007/s10540-005-2577-2
18. Agre P. The aquaporin water channels // *Proc Am Thorac Soc*. 2006. Vol. 3. P. 5–13. doi:10.1513/pats.200510-109JH
19. Sorbo J.G., Moe S.E., Holen T. Early upregulation in nasal epithelium and strong expression in olfactory bulb glomeruli suggest a role for Aquaporin-4 in olfaction // *FEBS Lett*. 2007. Vol. 581, N 25. P. 4884–4890. doi: 10.1016/j.febslet.2007.09.018
20. Alam J., Jeon S., Choi Y. Determination of Anti-aquaporin 5 auto-antibodies by immunofluorescence cytochemistry // *Methods Mol Biol*. 2019. Vol. 1901. P. 79–87. doi: 10.1007/978-1-4939-8949-2_6

REFERENCES

1. Basharin VA, Chepur SV, Shchegolev AV, et al. The role and place of respiratory support in the treatment regimens for acute pulmonary edema caused by inhalation of toxic substances. *Military Medical Journal*. 2019;340(11):26–32. (In Russ.) EDN: JPJONV
2. Shapovalov ID, Yaroshenko DM, Tolkach PG, et al. Experimental evaluation of the effectiveness of oxygen and prednisolone for the correction of toxic pulmonary edema caused by intoxication by thermal-destruction products of nitrocellulose. *Medline.ru*. 2024;25(1):205–219. EDN: BWCVDB
3. Patocka J. Perfluoroisobutene: poisonous choking gas. *Mil Med Sci Lett*. 2019;88(3):98–105. doi: 10.31482/mmsl.2019.006
4. Jugg BJ. Toxicology and treatment of phosgene induced lung injury. In: *Chemical Warfare Toxicology. Fundamental Aspects*. Edition: 1. Chapter: 4. Publisher: RSC. Worek F, Jener J, Thiermann H, eds. 2016;1:117–153. doi: 10.1039/9781782622413-00117
5. Berthiaume Y, Folkesson HG, Matthay MA. Lung edema clearance: 20 years of progress: invited review: alveolar edema fluid clearance in the injured lung. *J Appl Physiol* (1985). 2002;93(6):2207–2213. doi: 10.1152/jappphysiol.01201.2001
6. Skowronska A, Tanski D, Jaskiewicz L, Skowronski MT. Modulation by steroid hormones and other factors on the expression

- of aquaporin-1 and aquaporin-5. *Vitam Horm.* 2020;112;209–242. doi: 10.1016/bs.vh.2019.08.006
7. Zeuthen T. General models for water transport across leaky epithelia. *Int Rev Cytol.* 2002;215:285–317. doi: 10.1016/s0074-7696(02)15013-3
8. Berthiaume Y, Matthay MA. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;159(3):350–359. doi: 10.1016/j.resp.2007.05.010
9. King L, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Physiol.* 1996;58:619–648. doi: 10.1146/annurev.ph.58.030196.003155
10. Ohinata A, Nagai K, Nomura J, et al. Lipopolysaccharide changes the subcellular distribution of aquaporin 5 and increases plasma membrane water permeability in mouse lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326(3):521–526. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.216
11. Sugita M, Ferraro P, Dagenais A, et al. Alveolar liquid clearance and sodium channel expression are decreased in transplanted canine lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1440–1450. doi: 10.1164/rccm.200204-3120C
12. Hasan B, Li FS, Siyit A, et al. Expression of aquaporins in the lungs of mice with acute injury caused by LPS treatment. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014;200:40–45. doi: 10.1016/j.resp.2014.05.008
13. Ishibashi H, Suzuki S, Moriya T, et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(5):2309–2317. doi: 10.1210/jc.2002-021353
14. Cai-Zhi S, Hua Sh, Xiao-Wei H, et al. Effect of dobutamine on lung aquaporin 5 in endotoxine shockinduced acute lung injury rabbit. *J Thorac Dis.* 2015;7(8):1467–1477. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.08.22
15. Tolkach PG, Basharin VA, Chepur SV, et al. Ultrastructural changes in the air-blood barrier of rats in acute intoxication with furoplast pyrolysis products. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2020;169(2):235–241. (In Russ.) EDN: USZBXQ doi: 10.1007/s10517-020-04866-x
16. Tiunov LA, Golovenko NYa, Galkin BN, Barinov VA. Biochemical mechanisms of toxicity of nitrogen oxides. *Biology Bulletin Reviews.* 1991;111(5):738–750. (In Russ.) doi: 10.1007/s10540-005-2577-2
17. Agre P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed.* 2004;43(33):4278–4290. doi: 10.1007/s10540-005-2577-2
18. Agre P. The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:5–13. doi: 10.1513/pats.200510-109JH
19. Sorbo JG, Moe SE, Holen T. Early upregulation in nasal epithelium and strong expression in olfactory bulb glomeruli suggest a role for Aquaporin-4 in olfaction. *FEBS Lett.* 2007;581(25):4884–4890. doi: 10.1016/j.febslet.2007.09.018
20. Alam J, Jeon S, Choi Y. Determination of Anti-aquaporin 5 autoantibodies by immunofluorescence cytochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019;1901:79–87. doi: 10.1007/978-1-4939-8949-2_6

ОБ АВТОРАХ

***Дарья Тимофеевна Сизова**, соискатель;
ORCID: 0000-0001-7426-1746; eLibrary SPIN: 2769-5930;
e-mail: vmeda-nio@mil.ru

Павел Геннадьевич Толкач, д-р мед. наук;
ORCID: 0000-0001-5013-2923; eLibrary SPIN: 4304-1890

Александр Александрович Бардин, научный сотрудник;
ORCID: 0000-0002-5551-1815; eLibrary SPIN: 9987-7872

Владимир Николаевич Бабаков, канд. биол. наук

Николай Григорьевич Венгерович, д-р мед. наук, доцент;
ORCID: 0000-0003-3219-341X; eLibrary SPIN: 6690-9649;
e-mail: gniiiivm_5@mil.ru

Сергей Викторович Чепур, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0002-5324-512X; eLibrary SPIN: 3828-6730;
e-mail: gniiiivm_5@mil.ru

Вадим Александрович Башарин, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0001-8548-6836; eLibrary SPIN: 4671-8386

AUTHORS INFO

***Dar'ya T. Sizova**, applicant;
ORCID: 0000-0001-7426-1746; eLibrary SPIN: 2769-5930;
e-mail: vmeda-nio@mil.ru

Pavel G. Tolkach, MD, Dr. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0001-5013-2923; eLibrary SPIN: 4304-1890

Alexander A. Bardin, researcher;
ORCID: 0000-0002-5551-1815; eLibrary SPIN: 9987-7872

Vladimir N. Babakov, Cand. Sci. (Biology)

Nikolai G. Vengerovich, MD, Dr. Sci. (Medicine), associate professor;
ORCID: 0000-0003-3219-341X; eLibrary SPIN: 6690-9649;
e-mail: gniiiivm_5@mil.ru

Sergey V. Chepur, MD, Dr. Sci. (Medicine), professor;
ORCID: 0000-0002-5324-512X; eLibrary SPIN: 3828-6730;
e-mail: gniiiivm_5@mil.ru

Vadim A. Basharin, MD, Dr. Sci. (Medicine), professor;
ORCID: 0000-0001-8548-6836; eLibrary SPIN: 4671-8386

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author