

А.С. Ермакович

**ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМ С АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛОМ НА ПОКАЗАТЕЛИ
СИСТЕМЫ ОКСИДАНТЫ/АНТИОКСИДАНТЫ В ЛЕГКИХ
НОВОРОЖДЕННЫХ МОРСКИХ СВИНОК В УСЛОВИЯХ ГИПЕРОКСИИ**

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. Ж.А. Рутковская

Кафедра биологической химии

Резюме. Альфа-токоферол корригирует оксидантно/антиоксидантное равновесие в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии путем увеличения содержания токоферола, нормализации активности глутатионпероксидазы и уровня небелковых SH-соединений, а также снижения продуктов липопероксидации и окислительной модификации белков.

Ключевые слова: новорожденные морские свинки, гипероксия, антиоксиданты, токоферол.

Resume. Alpha-tocopherol corrects the oxidant/antioxidant equilibrium in the lungs of newborn guinea pigs under hyperoxia by increasing the tocopherol content, normalizing the activity of glutathione peroxidase and the level of non-protein SH-compounds, and also reducing lipoperoxidation products and oxidative modification of proteins.

Keywords: newborn guinea pigs, hyperoxia, antioxidants, tocopherol.

Актуальность. Достижения современной медицины позволяют выхаживать недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела. Способность такого ребенка выжить напрямую зависит от степени развития его органов и тканей. Для улучшения их оксигенации в виду функциональной и морфологической незрелости легочных структур, необходимо проведение искусственной вентиляции легких с использованием высоких концентраций кислорода. Окислительное повреждение легочных структур наряду с низким уровнем антиоксидантов являются наиболее вероятными патогенетическими факторами в развитии бронхолегочной дисплазии (БДЛ)[1].

Несмотря на наличие физиологических и морфологических доказательств токсического действия высоких доз кислорода на легкие, до настоящего времени биохимические механизмы, лежащие в основе этого явления, не установлены, что обуславливает отсутствие эффективных способов предупреждения этой патологии. Ввиду этого изучение метаболических нарушений в легких под действием гипероксии и возможности их коррекции является актуальной задачей. Поскольку в условиях гипероксии происходит стимуляция процессов пероксидации биологических мембран, патогенетически оправданным является использование антиоксидантов для предотвращения повреждения легочной ткани у новорожденных.

Важнейшим липофильным антиоксидантом в легких является витамин Е – альфа-токоферол. В экспериментальных исследованиях установлено, что дефицит витамина Е в условиях гипероксии способствует увеличению продукции активных форм кислорода и усиливает проявление воспаления и оксидативного стресса в легких [2]. В литературе описаны случаи введения альфа-токоферола перорально и внутримышечно для коррекции гиповитаминоза, однако улучшения состояния легких не наблюдалось. Наиболее вероятной причиной этого является неэффективность путей доставки токоферола из плазмы в легкие у недоношенных новорожденных. Однако известно, что в ткани легкого более эффективно поступает липосомная форма токоферола при его интратрахеальном введении [3].

Цель: изучить возможности использования альфа-токоферола в составе мультиламеллярных липосом для коррекции изменений в системе оксиданты/антиоксиданты в легких новорожденных морских свинок, вызванных действием длительной гипероксии.

Задачи:

1. Оценить влияние альфа-токоферола в составе мультиламеллярных липосом на содержание неферментативных (альфа-токоферол, SH-содержащие соединения) и активность ферментативных (глутатионпероксидаза) антиоксидантов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости и легких новорожденных животных в условиях длительной гипероксии.

2. Установить влияние альфа-токоферола в составе мультиламеллярных липосом на окислительную модификацию липидов и белков в бронхоальвеолярной жидкости новорожденных морских свинок.

Материал и методы. В эксперименте использовали новорожденных морских свинок, которые находились на стандартном рационе вивария БГМУ, с соблюдением этических норм и правил проведения работ с лабораторными животными. Были сформированы 4 группы животных: 1 группа – интактные животные; 2 группа – животные, которые подверглись гипероксии; 3 группа - интактные животные, которые получали ингаляционно альфа-токоферол; 4 группа – животные, которые во время воздействия гипероксии получали альфа-токоферол в составе мультиламеллярных липосом.

Для создания условий гипероксии новорожденных морских свинок помещали в плексигласовую камеру, где поддерживали концентрацию кислорода не менее 75% в течение 14 суток. Контрольные животные в течение такого же промежутка времени дышали обычным воздухом. α -Токоферол вводили ингаляционно с помощью компрессорного небулайзера. Вводимая смесь содержала α -токоферол (12,5 мг/кг) и ДПФХ (45мг/кг) в 0,1 М натрий-фосфатном буфере. По окончании инкубации животных наркотизировали тиопенталом натрия (15 мг/кг интраперитонеально).

Получали бронхоальвеолярную лаважную жидкость путем промывания легких через эндотрахеальный зонд раствором 0,9% NaCl (3-8 мл). Затем жидкость центрифугировали (900 об/мин, 40С) для осаждения клеток. Бесклеточный супернатант БАЛЖ использовали для определения активности глутатионпероксидазы (ГП), содержания восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений, карбонильных производных аминокислотных остатков в белках, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП). Содержание токоферола определяли в гомогенате ткани легкого.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 8,0. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический тест Манна-Уитни для независимых выборок (U-тест). Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. У животных, подвергшихся воздействию гипероксии, выявлено достоверное снижение содержания восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений в БАЛЖ на 33%, а также активности глутатионпероксидазы на 70% (таблица 1). Выраженное снижение активности ГП является крайне неблагоприятным, поскольку данный фермент способен обезвреживать не только активные формы кислорода, но и органические гидроперекиси, включая перекиси ненасыщенных жирных кислот

Таблица 1. Содержание неферментативных антиоксидантов и активность глутатианпероксидазы в БАЛЖ и в легких новорожденных морских свинок, подвергшихся воздействию гипероксии

Показатель	Контроль	Гипероксия
Небелковые SH-соединения, нмоль/мг белка	111,7 (60,2 – 178,6)	75,8 (36,7 – 121,3)*
ГП, нмоль/мин/ мг белка	49,5 (29,5 – 62,1)	15,2 (0 – 20,2)*
Токоферол, нмоль/мг белка/г ткани	305,4 (218,2 – 367,2)	188,3 (133,4 – 314,4) *

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»

Вдыхание смеси с высоким содержанием кислорода в течение 14 суток приводило к достоверному уменьшению содержания токоферола в легких на 39% ($p < 0,05$, таблица 1).

Снижение уровня глутатиона и токоферола привело к стимуляции процессов пероксидации белков и липидов. Нами выявлено, что содержание карбонильных производных аминокислот в белках достоверно не изменялось, но имело тенденцию к увеличению (таблица 2). А содержание вторичных продуктов ПОЛ, реагирующих с ТБК, в БАЛЖ в условиях гипероксии превышало контрольные значения в 1,9 раза и было статистически достоверным ($p < 0,05$, таблица 2).

Таблица 2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков в БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергшихся воздействию гипероксии

Показатель	Контроль	Гипероксия
Карбонильные производные, нмоль/мг белка	24,23 (20,58 – 25,95)	33,9 (14,39 – 46,25)
ТБК-РП, отн.ед.	4,52 (3,75 – 7,39)	8,67 (5,25 – 18,45)*

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»

После введения липосом с витамином Е содержание α -токоферола в легких опытных животных, подвергшихся гипероксии, увеличилось в 2 раза ($p < 0,05$) и соответствовало контрольным значениям (таблица 3). Известно, что α -токоферол является основным липофильным антиоксидантом в легких, поскольку входит в состав сурфактанта и защищает его от оксидантного повреждения. Механизм действия токоферола обусловлен не только способностью защищать липиды от окисления, обезвреживая свободные радикалы кислорода и липидные гидроперекиси, но и индукцией ферментов синтеза глутатиона и глутатион-зависимой системы [4].

Установлено, что ингаляционное введение липосом с α -токоферолом животным, которые подверглись воздействию гипероксии, сопровождалось нормализацией показателей системы глутатион/глутатионзависимые ферменты в БАЛЖ. Уровень восстановленного глутатиона увеличился в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с животными, которые длительно находились в условиях гипероксии и достоверно не отличалось от группы контроля. Активность глутатионпероксидазы в БАЛЖ также увеличилась в 4,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с животными, которые подверглись воздействию гипероксии, при этом разница с группой контроля была недостоверна.

Таблица 3. Содержание неферментативных антиоксидантов и активность глутатианпероксидазы в БАЛЖ и в легких новорожденных морских свинок, получивших ингаляционно токоферол

Показатель	Контроль	Гипероксия	Гипероксия +альфа-токоферол
Небелковые SH-соединения, нмоль/мг белка	111,7 (60,2 – 178,6)	75,8 (36,7-121,3)*	117,9 (113,0 –125,6)^
ГП, нмоль/мин/ мг белка	49,5 (29,5 – 62,1)	15,2 (0-20,2)*	61,8 (62,5 – 78,1)^
Токоферол, нмоль/мг белка/г ткани	305,4 (218,2 – 367,2)	188,3 (133,4-314,4)*	376,6 (353,5–441,3)^

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»

- ^ - $p < 0,05$ по сравнению с группой «гипероксия»

Увеличение содержания глутатиона и токоферола способствовало снижению оксидативных процессов с ткани легких новорожденных морских свинок. Подтверждением этому является уменьшение содержания карбонильных производных белков в БАЛЖ у животных, получивших ингаляционно α -токоферол, по сравнению с животными, подвергшимися гипероксии, на 54% (таблица 4).

Таблица 4. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков в БАЛЖ новорожденных морских свинок, получивших ингаляционно токоферол

Показатель	Контроль	Гипероксия	Гипероксия +альфа-токоферол
Карбонильные производные, нмоль/мг белка	24,23 (20,58 – 25,95)	33,9 (14,39 – 46,25)	15,53 (13,09-20,28)*^
ТБК-РП, отн.ед.	4,52 (3,75 – 7,39)	8,67 (5,25 – 18,45)*	4,05 (3,18-4,44)^

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»

- ^ - $p < 0,05$ по сравнению с группой «гипероксия»

Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, снизилось на 53% в БАЛЖ животных, которым вводился витамин Е в составе мультиламеллярных липосом, по сравнению с животными, находившимися в условиях длительной гипероксии.

Выводы. Ингаляционное введение липосом с α -ТФ корригирует оксидантно-антиоксидантное равновесие в легких новорожденных морских свинок за счет :

- 1 Увеличения содержания токоферола в легких;
- 2 Нормализации активности ГП и уровня небелковых SH-соединений в БАЛЖ;
- 3 Снижения содержания карбонильных производных и ТБК-активных продуктов в БАЛЖ.

A.S. Ermakovich

INFLUENCE OF ALPHA-TOCOPHEROL LIPOSOMES ON OXIDANT / ANTI-OXIDANT INDICATORS IN LUNGS OF NEWBORN GUINEA PIGS IN THE HYPEROXIA

*Tutors: associate professor Zh. A. Rutkovskaya
Department of Biological Chemistry
Belarusian State Medical University, Minsk*

Литература

1. Каганова Т.И., Романова-Салмина В.Д. Значение перекисного окисления липидов и антиоксидантов в развитии бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей // Успехи современного естествознания. 2010. №5 С.109-111.
2. Yamaoka, S. Severe vitamin E deficiency exacerbates acute hyperoxic lung injury associated with oxidative stress and inflammation / S. Yamaoka, H.S. Kim, T. Ogihara [et al.] // Free Radic. Res., 2008. – Vol. 42, N. 6. – P. 602-612.
3. Suntres, Z.E. Pulmonary uptake of liposome-associated alpha-tocopherol following intratracheal instillation in rats / Z.E. Suntres, S.R. Hepworth, P.N. Shek // J. Pharm. Pharmacol., 1993. – Vol. 45, N. 6. – P. 514-520.
4. Rimbach, G. Gene-regulatory activity of alpha-tocopherol / G. Rimbach, J. Moehring, P. Huebbe, J.K. Lodge // Molecules., 2010. – Vol. 15 (3). – P. 1746-1761.