

А.В. Дубейко

**ВЛИЯНИЕ РЕТИНОИДОВ В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ НА СИСТЕМУ
ПРОТЕАЗЫ/АНТИПРОТЕАЗЫ В ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ МОРСКИХ
СВИНОК В ДИНАМИКЕ ГИПЕРОКСИИ**

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

Кафедра биологической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A. V. Dubeyko

**THE EFFECT OF RETINOIDS IN THE COMPOSITION OF LIPOSOMES
ON THE PROTEASE/ANTI-PROTEASE SYSTEM IN THE LUNGS
OF NEWBORN GUINEA PIGS IN THE DYNAMICS OF HYPEROXIA**

Tutor: associate professor Zh.A. Rutkovskaya

Department of Biological chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом животным, подвергшимся длительному воздействию гипероксии, способствовало увеличению активности А1-ПИ, уменьшению содержания нейтрофильной эластазы и увеличению содержания коллагена в ткани легких новорожденных морских свинок.

Ключевые слова: протеаза, коллаген, гипероксия, ретиноиды, липосомы.

Resume. Inhalation administration of retinoids in the composition of liposomes to animals exposed to prolonged exposure to hyperoxia contributed to an increase in A1-PI activity, a decrease in the content of neutrophil elastase, and an increase in the content of collagen in the lung tissue of newborn guinea pigs.

Keywords: protease, collagen, hyperoxia, retinoids, liposomes.

Актуальность. Для поддержания жизни недоношенных новорожденных широко используются различные виды оксигенотерапии. Использование высоких концентраций кислорода на фоне респираторных нарушений приводит к формированию хронических заболеваний легких, в том числе, бронхолегочной дисплазии (БЛД). Повреждение легких сопровождается развитием воспалительной реакции с последующей репарацией в виде пролиферации фибробластов. Это ведет к нарастанию фиброзных изменений в легочной ткани [3].

Коллаген – основной белок межклеточного матрикса определяющий прочность и проницаемость альвеолокапиллярных мембран. В случае активного гидролиза коллагена до аминокислот, его содержание в легких уменьшается. Усиление распада соединительнотканых белков может быть вызвано воздействием активных форм кислорода (что и происходит при оксигенотерапии), а также влиянием протеаз. Одним из таких ферментов является фермент нейтрофильная эластаза (НЭ). Для контроля активности нейтрофильной эластазы существует специальный ингибитор – α 1-антитрипсин (или α 1-протеиназный ингибитор, А1-ПИ) [1].

Витамин А играет важную роль в процессах развития и репарации легких. Одним из способов, повышающим эффективность препаратов, считается включение их в липосомы, что облегчает проникновение веществ в клетку и увеличивает продолжительность их действия [2]. Ингаляционное введение ретиноидов ранее не применялось.

Цель: изучить влияние ретиноидов, включенных в состав липосом на содержание нейтрофильной эластазы, коллагена и активность $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора в легких новорожденных морских свинок в динамике гипероксии.

Материалы и методы. В эксперименте было сформировано 4 группы новорожденных морских свинок: 1 – контроль, 2 – гипероксия, 3 – контроль + ретиноиды, 4 – гипероксия + ретиноиды. В камерах с животными опытных групп постоянно поддерживали концентрацию кислорода не менее 70%. Контрольные животные дышали обычным воздухом. Экспериментальной группе морских свинок ингаляционно с помощью небулайзера вводилась смесь липосом, содержащих ретинол (6 мг/кг) и ретиноевую кислоту (0,6 мг/кг). В качестве материала для исследования использовали гомогенат легких. Определялись следующие показатели: содержание нейтрофильной эластазы, коллагена и активность $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора.

Содержание нейтрофильной эластазы определялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Содержание эластазы в гомогенате легких выражали в нг/мг белка/г ткани. Активность $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора определялось спектрофотометрическим методом, предложенным Нартиковой и Пасхиной. Метод основан на торможении аргинин-эстеразной активности трипсина. Активность А1-ПИ выражали в ингибиторных единицах (мИЕ/мг белка/г ткани). Для определения содержания коллагена в гомогенатах легких использовали метод экстракции его кислотными растворителями. Содержание коллагена в гомогенатах выражали в мкг/г ткани/24 часа.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8,0. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (25 перцентиль – 75 перцентиль).

Результаты и их обсуждение. При непродолжительном воздействии гипероксии (3 суток) у контрольных животных не происходит достоверного изменения изучаемых показателей. При увеличении сроков гипероксии до 14 суток увеличение активности А1-ПИ не оказывает должного сдерживающего эффекта, в результате чего возрастает содержание нейтрофильной эластазы в легких в 3 раза ($p < 0,05$). Повреждение в системе протеазы-антипротеазы отражает наличие повреждений в белковых структурах легких в условиях гипероксии: на 14-е сутки содержание коллагена в легких опытных животных уменьшилось в 1,4 раза ($p < 0,05$), в то время как у контрольных животных практически не изменилось.

Полученные результаты свидетельствуют, что усиление активности А1-ПИ оказалось эффективным только при непродолжительном воздействии гипероксии (3 суток). При увеличении сроков гипероксии до 14 суток увеличение активности А1-ПИ не оказало должного сдерживающего эффекта, в результате чего возросло содержание нейтрофильной эластазы в легких. Можно предполагать наличие нескольких механизмов этого явления. Во-первых, данный ингибитор является чувствительным к окислительному повреждению, так как в его активном центре присутствует метионин, способный окисляться с образованием метионин сульфоксида, что приводит к инактивации фермента. Другой причиной, может быть протеолитическое расщепление молекул А1-ПИ за счет действия металло- и сериновых протеаз, которые продуцируются нейтрофилами и макрофагами легких в зоне воспаления [1].

Табл. 1. Содержание эластазы, коллагена и активность А1-ПИ

Показатель	Группа		Без коррекции	+ Ретиноиды
А1-ПИ, МИЕ/мг белка/г ткани	3 суток	контроль	17,0 (6,4 – 28,3)	9,9 (8,8 – 10,7)
		гипероксия	30,9 (10,5 – 47,1)*	27,8 (19,5 – 38,2)
	14 суток	контроль	12,4 (6,3 – 28,3)	9,1 (8,5 – 11,7)
		гипероксия	22,1 (14,3 – 37,2)*	31,1 (17,5 – 35,3)*
Эластаза, пг/мг белка/г ткани	3 суток	контроль	10,4 (9,5 – 15,4)	12,4 (9,4 – 14,3)
		гипероксия	8,7 (5,7 – 17,2)	9,1 (8,2 – 13,5)
	14 суток	контроль	13,5 (10,2 – 19,2)	7,9 (6,3 – 9,4)*
		гипероксия	40,1 (22,0 – 63,4)*	8,4 (5,6 – 13,7)^
Коллаген, мкг/г ткани/24часа	3 суток	контроль	501,6 (451,1 – 593,5)	597,1 (496,3 – 723,5)
		гипероксия	633,9 (564,9 – 809,4)*	544,7 (461,7 – 587,5)
	14 суток	контроль	512,8 (443,2 – 563,5)	558,6 (460,5 – 658,9)
		гипероксия	364,9 (242,9 – 453,3)*	878,3 (728,4 – 904,3)*^

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «контроль без коррекции», ^ - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «гипероксия без коррекции».

Введение ретиноидов не привело к достоверному увеличению активности А1-ПИ у животных 4 группы по сравнению с группой «гипероксия 14 суток», однако этот показатель был повышен более чем в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «контроль». Также у животных 4 группы уменьшилось содержание нейтрофильной эластазы в 4,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «гипероксия» и восстановилось соотношение протеазы/антипротеазы. Восстановление баланса в системе «протеазы/антипротеазы» должно предотвращать деструктивные повреждения легочной ткани. Подтверждением этому является выявленное нами увеличение содержания коллагена в гомогенате более чем в 2,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «гипероксия 14 суток». Можно заключить, что при введении витамина А происходит подавление протеолитических процессов в легких. Кроме того, известно, что ретиноиды являются индукторами синтеза эластина и коллагена [2]. Этим может объясняться тот факт, что уровень коллагена у опытных животных с коррекцией ретиноидами был выше, чем у контрольных животных.

Заключение. Ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом животным, подвергшимся длительному воздействию гипероксии, способствовало увеличению активности А1-ПИ, уменьшению содержания нейтрофильной эластазы и увеличению содержания коллагена в ткани легких новорожденных морских свинок.

Информация о внедрении результатов исследования. По результатам настоящего исследования опубликовано 5 статей и 2 тезиса докладов в сборниках материалов, получено 3 акта внедрения в образовательный процесс (кафедра биологической химии, биоорганической химии и патологической физиологии БГМУ).

Литература

1. Аверьянов, А. В. Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни легких / А. В. Аверьянов // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, №4. – С. 3-8.
2. Ambalavanan, N. Vitamin A supplementation for extremely low birth weight infants / N. Ambalavanan, J.E. Tyson, K.A. Kennedy [et al.] // Pediatrics. – 2005. – Vol.115, No. 3. – P. e249-e254.
3. Blennow, M. Surfactant and noninvasive ventilation / M. Blennow, K. Bohlin. – Neonatology, 2015. – P. 330-336.