

# ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ КОМПОНЕНТОВ СУРФАКТАНТА И ПРОДУКТОВ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ

*Котович И.Л., Рутковская Ж.А.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Одним из факторов, провоцирующих развитие бронхолегочной дисплазии, считается длительное использование искусственной вентиляции легких с высокой концентрацией кислорода во вдыхаемой смеси. В работе изучено изменение фосфолипидного состава сурфактанта и степень окислительного повреждения липидов и белков в бронхоальвеолярном пространстве новорожденных морских свинок в динамике длительной гипероксии. Выявлено значительное снижение уровня фосфолипидов сурфактанта, уменьшение активности фосфолипазы  $A_2$ , увеличение содержания окисленных липидов и продуктов окислительной модификации белков в бронхоальвеолярной жидкости под влиянием длительной гипероксии.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженных изменениях со стороны липидных и белковых компонентов бронхоальвеолярного пространства в условиях гипероксии, что может вносить вклад в патогенез бронхолегочной дисплазии.

**Ключевые слова:** гипероксия, бронхоальвеолярная жидкость, фосфолипиды, белки.

**Введение.** Легочный сурфактант — это высокоспециализированный поверхностно-активный материал, состоящий в основном из фосфолипидов (ФЛ) и сурфактантных белков (СБ), который покрывает весь альвеолярный эпителий легкого. Синтез, секрецию и реутилизацию сурфактанта осуществляют альвеолоциты II типа. Преобладающей фракцией среди ФЛ сурфактанта является ФХ (85%), основная масса которого является динасьщенным. В сурфактанте также присутствуют фосфатидилглицерол (ФГ), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), сфингомиелин (СМ). Доля нейтральных липидов, в т. ч. холестерина, не превышает 5%. В катаболизме сурфактантных липидов и белков важную роль играют также альвеолярные макрофаги, продуцирующие секреторную фосфолипазу  $A_2$ , которая разрушает фосфолипиды во внеклеточном пространстве [1].

Известно, что система легочного сурфактанта играет важную роль не только в нормальном функционировании легких, но и в развитии легочных заболеваний (пневмофиброз, саркоидоз и др.). Особое значение имеет состояние этой системы у недоношенных новорожденных, поскольку синтез и секреция компонентов сурфактанта достигает функционально зрелого уровня лишь к 36-й неделе гестации.

В настоящее время растет количество недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. Выхаживание таких новорожденных невозможно без использования искусственной вентиляции легких (ИВЛ) с высокой концентрацией кислорода во вдыхаемой смеси. Однако в большинстве случаев у таких детей впоследствии развивается тяжелое хроническое заболевание — бронхолегочная дисплазия (БЛД). Среди факторов, провоцирующих развитие БЛД, отмечают баро- и волюмотравму, токсическое действие высоких доз кислорода, незрелость тканей легких и недостаточность антиоксидантных систем у недоношенных. Считается, что в условиях гипероксии увеличивается продукция активных форм кислорода, что провоцирует развитие окис-

лительного стресса. Основными мишенями для активных форм кислорода (АФК) являются липиды мембран, белки и ферменты, ДНК. В то же время единое мнение о степени повреждающего действия высоких концентраций кислорода на легочные структуры отсутствует, поскольку в условиях гипероксии не было выявлено накопления продуктов липопероксидации в легких [2].

**Цель работы** — изучение в эксперименте характера изменения фосфолипидного состава сурфактанта и оценка степени окислительного повреждения липидов и белков в бронхоальвеолярном пространстве в динамиче- длительной гипероксии.

**Материалы и методы.** В работе использовались новорожденные морские свинки, которые находились на стандартном рационе вивария БГМУ. Эксперимент проводили с соблюдением этических норм и правил работы с лабораторными животными. Для создания условий гипероксии новорожденных животных сразу после рождения помещали в плексигласовую камеру, где поддерживали концентрацию кислорода не менее 75%. Длительность инкубации в условиях гипероксии составляла 3, 7 и 14 сут. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. По окончании инкубации животных обеих групп наркотизи- ровали тиопенталом натрия (15 мг/кг интраперитонеально) и проводили промывание легких через эндотра- хеальный зонд раствором 0,9% NaCl (3×8 мл). В полученной бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) определяли содержание основных сурфактантных фракций фосфолипидов, общего белка, продуктов, реагирую- щих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (малонового диальдегида и др.), карбонильных производных белков, ак- тивность фосфолипазы А<sub>2</sub>. Степень разведения бронхоальвеолярной жидкости оценивали по содержанию моче- вины и учитывали при расчетах. Содержание ТБК-активных продуктов и карбонильных производных в белках определяли также в гомогенатах легких.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Для оцен- ки достоверности различий между группами использовали непараметрический U-тест Манна–Уитни для не- зависимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (медиана — 25; 75 процентиль).

**Результаты и их обсуждение.** Во всех группах преобладающей фракцией среди фосфолипидов сурфак- танта был фосфатидилхолин. Его доля в среднем составляла 78%, при этом более 60% было представлено дина- сыщенной формой, что подтверждает принадлежность выделенных фосфолипидов к сурфактанту легких.

Достоверных изменений в содержании фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости животных, нахо- дившихся в условиях гипероксии в течение 3 и 7 сут, не обнаружено (таблица 1). Однако наблюдалась выражен- ная тенденция к прогрессирующему снижению уровня основных фосфолипидных фракций и общего липидно- го фосфора (ОЛФ).

Таблица 1. — Влияние гипероксии на содержание основных фосфолипидных фракций сурфактанта в бронхоальвеолярной жидкости

Фосфолипиды	Длительность воздействия гипероксии, сут					
	3		7		14	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
ЛизоФХ	0,041 (0,033; 0,047)	0,030 (0,021; 0,048)	0,041 (0,032; 0,047)	0,000 (0,000; 0,087)	0,293 (0,040; 0,397)	0,000 (0,000; 0,000)*
СМ	0,038 (0,020; 0,054)	0,000 (0,000; 0,009)	0,039 (0,020; 0,049)	0,000 (0,000; 0,087)	0,312 (0,050; 0,426)	0,000 (0,000; 0,000)*
ФЭА	0,214 (0,135; 0,250)	0,181 (0,123; 0,228)	0,460 (0,354; 0,783)	0,424 (0,398; 0,872)	3,684 (1,964; 4,436)	0,245 (0,195; 0,326)*
ДНФХ	1,250 (0,903; 2,600)	1,200 (1,100; 1,540)	2,010 (1,730; 2,950)	1,245 (0,825; 2,450)	5,720 (4,915; 9,100)	2,500 (1,525; 3,150)*
ФХ сумм.	2,277 (1,695; 3,446)	1,614 (1,592; 2,272)	3,099 (2,467; 4,760)	2,006 (1,416; 3,442)	9,228 (7,776; 14,961)	3,205 (2,115; 3,807)*
ОЛФ	2,491 (1,820; 4,613)	1,614 (1,598; 2,389)	3,733 (3,466; 3,998)	2,236 (1,830; 3,464)	13,228 (12,891; 15,484)	3,342 (2,252; 3,807)*

Примечание — \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

У животных, находившихся в условиях гипероксии в течение 14 сут, выявлено значительное снижение уровня фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости. Содержание фосфатидилхолина уменьшилось в сред-

нем в 3 раза по сравнению с контролем. Другие фракции фосфолипидов либо не определялись вовсе (как лизофосфатидилхолин и сфингомиелин), либо обнаруживались в минимальных количествах (фосфатидилэтаноламин, 7% от контроля). Примечательно, что доля насыщенного фосфатидилхолина в опытной группе (14 сут) увеличилась и составила 82,6% (77,7; 85,3), что значительно выше, чем в контроле (61,8 (60,8; 63,3),  $p < 0,05$ ). Поскольку этот липид содержит только насыщенные жирные кислоты, он является наиболее устойчивым к окислительному воздействию. Таким образом, такая перестройка в составе фосфолипидов представляется закономерной. Тем не менее резкое снижение уровня сурфактантных фосфолипидов может вносить вклад в развитие патологических изменений в легких.

В частности, известно, что изменения со стороны сурфактанта легких играют важную роль в формировании пневмофиброза [3]. Мы полагаем, что нарушения со стороны сурфактантных фосфолипидов в условиях длительной гипероксии могут рассматриваться как один из патогенетических аспектов бронхолегочной дисплазии, поскольку развитие фиброзных изменений в легких характерно для данной патологии. Обращает на себя внимание и тот факт, что существенные изменения в фосфолипидном составе бронхоальвеолярной жидкости развивались лишь в результате длительного воздействия высоких доз кислорода (14 сут). Исследования других авторов также не выявили изменений со стороны синтеза и секреции компонентов сурфактанта клетками легких в условиях более кратковременного воздействия гипероксии [2].

Мы предполагали, что снижение уровня фосфатидилхолина в бронхоальвеолярной жидкости может быть связано с усилением его катаболизма в альвеолярном пространстве под действием секреторной фосфолипазы  $A_2$ , которая продуцируется альвеолярными макрофагами. Мы исследовали активность данного фермента у контрольных и опытных животных на 14-е сут гипероксии. Активность фосфолипазы  $A_2$  в опытной группе составила 2,23 (1,81; 2,55) нмоль/мин/мг белка/мл бронхоальвеолярной жидкости, что достоверно ниже, чем в контроле (6,17 (5,65; 8,59) нмоль/мин/мг белка/мл бронхоальвеолярной жидкости,  $p < 0,05$ ). Низкая активность фосфолипазы  $A_2$  соответствовала низкому содержанию лизофосфатидилхолина (продукта, образующегося при распаде фосфатидилхолина под действием данного фермента) (таблица 1). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что фосфолипаза  $A_2$  не может являться причиной уменьшения количества фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости при длительной гипероксии.

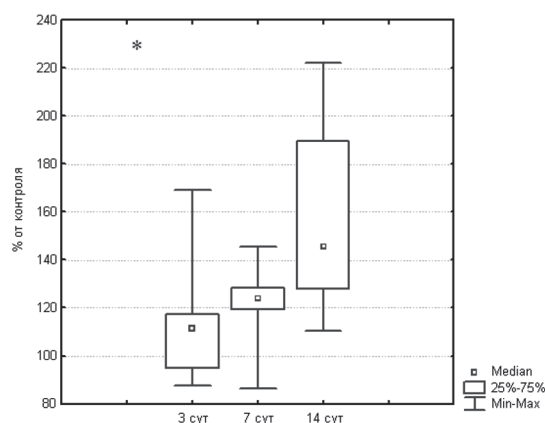
Другой наиболее вероятной причиной резкого уменьшения содержания фосфолипидов в бронхоальвеолярном пространстве в условиях длительной гипероксии нам представлялось окислительное повреждение компонентов сурфактанта. Для того чтобы оценить интенсивность процессов перекисного окисления, нами определялось содержание малонового диальдегида и других ТБК-активных продуктов в бронхоальвеолярной жидкости и гомогенате легких. Полученные результаты представлены в таблице 2. Содержание ТБК-активных продуктов в гомогенате легких животных, находившихся в условиях гипероксии, достоверно не изменялось. На 14-е сут выявлено резкое уменьшение уровня продуктов перекисного окисления липидов в бронхоальвеолярной жидкости; в более короткие сроки инкубации изменений обнаружено не было.

Таблица 2. — Влияние гипероксии на содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в бронхоальвеолярной жидкости и гомогенате легких

Содержание ТБК-активных продуктов	Длительность воздействия гипероксии, сут					
	3		7		14	
	контроль (n = 5)	опыт (n = 5)	контроль (n = 5)	опыт (n = 5)	контроль (n = 6)	опыт (n = 5)
в БАЖ, нмоль/мг белка/мл БАЖ	35,1 (29,4; 35,9)	40,0 (35,9; 40,8)	66,3 (45,5; 74,6)	57,3 (46,7; 66,9)	113,4 (88,6; 165,6)	34,9 (27,0; 52,5)*
В гомогенате легких, нмоль/г ткани	14,2 (9,3; 16,2)	12,5 (8,1; 16,7)	16,8 (14,9; 20,8)	17,3 (12,2; 20,1)	19,2 (11,3; 22,8)	19,1 (16,6; 21,2)

1 — \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.  
2 — БАЖ — бронхоальвеолярная жидкость..

Выраженное снижение уровня продуктов, реагирующих с ТБК, в бронхоальвеолярной жидкости на 14-е сут гипероксии, на первый взгляд, кажется парадоксальным. Однако необходимо учитывать и значительное уменьшение общего количества фосфолипидов, которое обнаружено у этой группы животных. При расчете соотношения ТБК-активные продукты/общий липидный фосфор оказалось, что доля продуктов липопероксидации в бронхоальвеолярной жидкости увеличивалась по мере увеличения длительности воздействия высоких доз кислорода (рисунок). На 7-е сут выявлена отчетливая тенденция к увеличению данного коэффициента, которая, однако, не была статистически достоверна. На 14-е сут гипероксии коэффициент ТБК-активные продукты/общий липидный фосфор примерно в 1,5 раза превышал аналогичный показатель контрольной группы ( $p < 0,05$ ).



\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

**Рисунок — Изменение соотношения ТБК-активные продукты/общий липидный фосфор в условиях гипероксии в динамике**

Подобные результаты были получены и при анализе степени окислительной модификации белков. Выявлено достоверное увеличение уровня карбонильных производных аминокислотных остатков в бронхоальвеолярной жидкости животных, находившихся в условиях гипероксии (таблица 3).

**Таблица 3. — Влияние гипероксии на содержание общего белка и карбонильных производных в бронхоальвеолярной жидкости**

Показатель	Длительность воздействия гипероксии, сут					
	3		7		14	
	контроль (n = 6)	опыт (n = 5)	контроль (n = 6)	опыт (n = 4)	контроль (n = 6)	опыт (n = 5)
Общий белок, мкг/ мл БАЖ	850,0 (700,0; 1050,0)	1425,0 (1000,0; 1650,0)*	887,5 (687,5; 1150,0)	824,4 (632,5; 1093,3)	845,8 (728,3; 1007,5)	1177,9 (751,5; 1620,8)
Карбонильные производные, нмоль/мг белка/мл БАЖ	153,3 (140,9; 180,1)	229,9 (185,3; 242,2)*	175,2 (141,2; 190,9)	264,2 (225,9; 272,5)*	150,5 (144,0; 162,2)	279,2 (271,3; 279,2)*
Примечания: 1 — * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем. 2 — БАЖ — бронхоальвеолярная жидкость.						

В отличие от продуктов перекисного окисления липидов продукты окислительной модификации белков уже на 3-е сут обнаруживались в количестве, в 1,5 раза превышающих контрольные значения ( $p < 0,05$ ). При более длительной инкубации (7 сут) описанные изменения сохранялись, а в дальнейшем даже имели тенденцию к умеренному нарастанию (185,5% от контроля на 14-е сут гипероксии). Достоверных изменений в содержании карбонильных производных в гомогенатах легких обнаружено не было (данные не представлены).

Уровень общего белка в бронхоальвеолярной жидкости опытных животных, находившихся в условиях гипероксии в течение 3-х сут, был в среднем в 1,7 раза выше, чем в контроле (таблица 3). В других опытных группах содержание белка в альвеолярной жидкости достоверно не изменялось, хотя после воздействия высоких доз кислорода в течение 14 сут имела тенденция к его увеличению.

Судить о происхождении общего белка в бронхоальвеолярной жидкости можно лишь предположительно, отсюда трудности в интерпретации обнаруженных изменений этого показателя. Чаще всего увеличение уровня белка в альвеолярном пространстве является следствием транссудации белков плазмы крови (альбуминов) и наблюдается при воспалении, а также при отеке легких [4]. Однако у экспериментальных животных в нашем исследовании не наблюдалось симптомов подобного состояния. В литературе есть сведения об увеличении содержания сурфактант-ассоциированного белка А (SP-A) под влиянием гипероксии [3]. Однако доля этого белка среди других белков бронхоальвеолярной жидкости невелика и составляет в среднем 1–2,5% [5].

**Заключение.** В условиях длительной гипероксии (14 сут) значительно изменяется количество и состав фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости: содержание фосфатидилхолина уменьшается в 3 раза, другие фосфолипидные фракции практически не определяются, а доля динасыщенного фосфатидилхолина увеличивается.

При относительно кратковременном воздействии гипероксии (3 сут) содержание общего белка в бронхоальвеолярной жидкости значительно увеличивается, а при более длительном воздействии практически не отличается от контроля.

Доля продуктов перекисного окисления липидов в перерасчете на общее количество фосфолипидов в БАЛЖ в условиях длительной гипероксии (14 сут) значительно увеличена. Это связано, главным образом, со снижением суммарного количества фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости в этот период гипероксии.

Под влиянием гипероксии усиливается окислительная модификация белков в альвеолярном пространстве, что может служить причиной снижения активности фосфолипазы A<sub>2</sub>.

Полученные данные свидетельствуют о выраженных изменениях со стороны липидов и белков в бронхоальвеолярном пространстве у новорожденных животных, длительно находившихся в условиях гипероксии, что может вносить вклад в развитие патологических изменений в легких при бронхолегочной дисплазии.

### Литература

1. Touqui, L. Interaction of secreted phospholipase A<sub>2</sub> and pulmonary surfactant and its patho-physiological relevance in acute respiratory distress syndrome / L.Touqui, Y.-Z.Wu // *Acta Pharmacol Sin.* — 2003. — Vol. 24, № 12. — P. 1292–1296.
2. Effect of hyperoxia on the composition of the alveolar surfactant phospholipids, cholesterol, plasmalogens and vitamin E / A. Tölle [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1997. — Vol. 1346, № 2. — P. 198–204.
3. Nkadi, P.O. An overview of pulmonary surfactant in the neonate: genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease / P.O. Nkadi, T.A. Merritt, D.-A.M. Pillers // *Mol.Genet. Metab.* — 2009. — Vol. 97, № 2. — P. 95–101.
4. Reynolds, H.Y. Bronchoalveolar lavage / H.Y. Reynolds // *Am. Rev. Respir. Dis.* — 1987. — Vol. 135, № 1. — P. 250–263.
5. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema / A. Günther [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1996. — Vol. 153, № 1. — P. 176–184.

## DYNAMICS OF CHANGES IN THE LEVEL OF SURFACTANT COMPONENTS AND LIPID AND PROTEIN PEROXIDATION PRODUCTS IN BRONCHOALVEOLAR FLUID IN EXPERIMENTAL MODELING OF BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA

*Kotovich I.L., Rutkovskaya Zh.A.*

*Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus*

One of the factors that provoke the development of bronchopulmonary dysplasia considered to be the use of mechanical ventilation with high concentrations of oxygen in the inspired mixture. The paper contains data obtained in studying the dynamical change of surfactant phospholipid composition and the degree of oxidative damage of lipids and proteins in bronchoalveolar space of newborn guinea pigs exposed to long-term hyperoxia. There was a significant decrease in the level of surfactant phospholipids, reduced activity of phospholipase A<sub>2</sub>, an increase in the content of oxidized lipids and products of oxidative modification of proteins in the bronchoalveolar fluid under the influence of prolonged hyperoxia (14 days).

The revealed hyperoxia-induced changes in the lipid and protein components in bronchoalveolar space may contribute to the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia.

**Keywords:** hyperoxia, bronchoalveolar fluid, lipids, proteins.