

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИПОСОМ С N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИИ

Рутковская Ж.А., Котович И.Л.

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

Реферат. При выхаживании недоношенных новорожденных широко используется искусственная вентиляция легких с поддержанием высоких уровней парциального давления кислорода в крови, что необходимо для развития легочной ткани и поддержания полноценного газообмена. Однако кислород является мощным окислителем и источником свободных радикалов, что позволяет предполагать развитие «оксидативного стресса», который у новорожденных протекает на фоне недостатка антиоксидантных систем и служит одним из факторов повреждения ткани легкого и развития бронхолегочной дисплазии, ретинопатии, внутримозговых кровоизлияний. Для коррекции повреждений, вызванных длительной гипероксией, использовали N-ацетилцистеин, который защищает клетки организма от влияния свободных радикалов. Ингаляционное введение мультиламеллярных липосом с N-ацетилцистеином увеличивает активность ферментов антиоксидантной защиты, снижает содержание ТБК-активных продуктов и увеличивает осмотическую резистентность эритроцитов, что свидетельствует о повышении их устойчивости к повреждениям, которые вызваны длительным воздействием гипероксии.

Ключевые слова: новорожденные морские свинки, гипероксия, антиоксидантные ферменты, ТБК-активные продукты, N-ацетилцистеин.

Введение. В большинстве развитых стран частота преждевременных родов в последние десятилетия составляет 5–10% от числа родившихся детей. У недоношенного ребенка выявляется незрелость всех функциональных систем, особенно жизненно важных, к которым относится система дыхания. Искусственная вентиляция легких (ИВЛ) с поддержанием высоких уровней парциального давления кислорода в крови новорожденного необходима для развития легочной ткани, выработки сурфактанта и поддержания полноценного газообмена.

Кислород является мощным окислителем и источником свободных радикалов. Накопление активных форм кислорода (АФК) в значительных количествах может сопровождаться целым рядом негативных изменений, среди которых наибольшее значение имеют снижение прочности и разрушение биологических мембран в результате нарушения структуры липопротеинов, структурно-функциональные нарушения ферментных систем дыхания, ослабление биосинтеза макроэргических соединений, разрушение мембран эритроцитов, нарушения процессов клеточного дыхания и развитие гемолиза. У новорожденных при этом возникает ряд патологических процессов, наиболее серьезные из которых выражаются в развитии бронхо-легочной дисплазии, ретинопатии, внутримозговых кровоизлияний.

Среди вероятных причин развития патологических изменений считают механическое повреждение легких при ИВЛ, токсическое действие кислорода, инфекции, незрелость легочной ткани и недостаточность антиоксидантных систем у недоношенных новорожденных [1]. Принимая во внимание последний факт, предпринимались попытки коррекции антиоксидантного статуса новорожденных с использованием N-ацетилцистеина (внутривенно), витамина А и его производных (перорально и внутримышечно), витамина Е (перорально), Cu-Zn-супероксиддисмутазы (ингаляционно) [2–4]. Полученные результаты были неоднозначными, и в настоящий момент эти методы не нашли применения в практике в связи с незначительной эффективностью, а также в ряде случаев с достаточно высокой инвазивностью.

В настоящей работе для коррекции повреждений, вызванных длительной гипероксией, мы использовали N-ацетилцистеин (N-АЦ), который является фармакопейным препаратом и широко используется при различных видах патологии легких, в т. ч. в ингаляционной форме. Данный препарат имеет выраженное антиоксидантное действие. Благодаря наличию свободной сульфгидрильной группы он может связывать свободные радикалы кислорода — супероксидный радикал, синглетный кислород и гидроксидный радикал, также он является донором цистеина для γ -глутамильного цикла, в котором доступность данной аминокислоты является лимитирующим фактором [5].

По мнению исследователей, включение N-ацетилцистеина в липосомы увеличивает продолжительность его действия, способствует его проникновению в клетки и тем самым повышает его терапевтическую эффективность [6]. Известно, что липосомальная форма N-ацетилцистеина эффективно защищала легкие крыс от острого повреждения, индуцированного шоком [7]. В настоящее время в доступной литературе отсутствуют данные об использовании липосомальной формы N-ацетилцистеина с целью коррекции изменений, вызванных воздействием гипероксии на организм новорожденных.

Цель работы — изучение влияния липосомальной формы N-АЦ на активность ферментов антиоксидантной защиты, содержание восстановленного глутатиона, ТБК-активных продуктов и осмотическую резистентность эритроцитов новорожденных морских свинок, которые длительно находились в условиях гипероксии.

Материалы и методы. В эксперименте использовали новорожденных морских свинок. Исследование проводилось с соблюдением этических норм и правил работ с лабораторными животными. Животных сразу после рождения помещали на 14 сут в среду с высоким содержанием кислорода (не менее 75%). Ингаляционное введение мультиламеллярных липосом, содержащих N-ацетилцистеин (250 мг/кг), L- α -дипальмитоилфосфатидилхолин (50 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH = 7,4, проводили с помощью ком-

прессорного небулайзера. Ингаляции проводили 1 раз в два дня в течение всего срока действия гипероксии. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. В каждой экспериментальной группе находилось 4–5 животных.

По окончании эксперимента животных наркотизировали раствором тиопентала натрия и получали кровь для исследования. Определяли осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ). В отмытых эритроцитах спектрофотометрически определяли содержание гемоглобина, ТБК-активных продуктов, восстановленного глутатиона (G-SH), активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6фДГ), супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический тест Манна–Уитни для независимых выборок. Данные представлены в таблице как Me (25, 75-й процентиль). Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Инициатором процессов свободнорадикального окисления в эритроцитах является реакция окисления двухвалентного железа в составе гемоглобина. В обычных условиях окислению подвергается только 0,5% двухвалентного железа, но в условиях гипероксии этот процесс может протекать более интенсивно, что приведет к увеличению продукции супероксидного радикала. Обезвреживание супероксидного радикала происходит в реакции дисмутации с участием СОД и ведет к образованию пероксида водорода. Непосредственной опасности для клетки пероксид водорода не представляет, поскольку быстро разрушается каталазой. В эритроцитах новорожденных животных, находившихся в среде с повышенным содержанием кислорода, через 14 сут снижается активность каталазы в 3,0 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными (таблица 1).

Кроме каталазы в обезвреживании перекисей, в т. ч. пероксида водорода, активно участвует система глутатиона и глутатионзависимых ферментов (ГП и ГР). ГП непосредственно катализирует расщепление пероксида водорода, используя для этого G-SH. Восстановление глутатиона происходит при участии ГР. В эритроцитах новорожденных животных, находившихся в условиях гипероксии 14 сут, не изменяется содержание восстановленного глутатиона, но снижается активность ферментов, участвующих в его метаболизме. Активность ГП и ГР снижается соответственно в 1,2 ($p < 0,05$) и 2,5 раза ($p < 0,05$) (таблица 1). Одной из причин может быть недостаток коферментов, необходимых для их работы. ГП является селензависимым ферментом, а запасы селена, как свидетельствуют литературные данные, в условиях интенсификации процессов свободнорадикального окисления в организме, быстро истощаются. ГР активно работает только при наличии в клетке достаточного количества восстановленного НАДФН.Н+. В образовании этого кофермента принимает участие Г6фДГ. При длительном воздействии гипероксии активность этого фермента снижается в 1,7 раза ($p < 0,05$). Нельзя исключить и другие возможные механизмы снижения активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах при гипероксии. В частности, из литературы хорошо известно повреждение ферментов продуктами свободнорадикального окисления. Причем в первую очередь повреждаются те из них, которые имеют в своем составе свободные SH-группы.

Таблица 1. — Влияние липосом с N-ацетилцистеином на активность антиоксидантных ферментов и содержание глутатиона в эритроцитах новорожденных морских свинок при длительном воздействии гипероксии

Показатель	Контроль	Гипероксия 14 сут	Гипероксия 14 сут + N-Ац
Глутатион восстановленный, мкмоль/г Hb	160,57 (146,70–173,45)	159,51 (153,23–164,49)	181,5 (163,25–184,55)
Глутатионпероксидаза, мкмоль/мин/г Hb	290,22 (272,67–322,05)	236,71* (186,19–280,18)	291,45 (274,81–310,24)
Глутатионредуктаза, мкмоль/мин/г Hb	705,06 (328,48–806,93)	287,76* (251,50–377,33)	958,85^ (473,65–1236,11)
Глюкозо-6-ф-ДГ, мкмоль/мин/г Hb	20,61 (18,59–23,64)	12,24* (9,10–14,70)	28,30*^ (23,86–31,95)
Супероксиддисмутаза, U/г Hb	711,64 (627,07–880,19)	705,52 (665,18–770,44)	880,18^ (697,29–952,97)
Каталаза, E/г Hb	221,25 (151,7–222,28)	73,05* (67,85–78,25)	195,77^ (178,58–207,09)
Примечания: 1 — * — различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$. 2 — ^ — различия по отношению к группе «гипероксия 14 сут» достоверны при $p < 0,05$			

Таблица 2. — Влияние липосом с N-ацетилцистеином на содержание ТБК-активных продуктов и осмотическую резистентность эритроцитов новорожденных морских свинок при длительном воздействии гипероксии

Показатель	Контроль	Гипероксия 14 сут	Гипероксия 14 сут + N-Ац
ТБК-активные продукты, мкмоль/г Нб	343,54 (296,87–349,46)	392,29* (350,84–399,56)	312,45^ (234,14–345,08)
ОРЭ (% гемолиза в 0,45% растворе NaCl)	23,71 (22,47–25,63)	86,39* (84,56–90,43)	70,21*^ (68,94–71,83)
Примечания: 1 — * — различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$. 2 — ^ — различия по отношению к группе «гипероксия 14 сут» достоверны при $p < 0,05$			

Таким образом, в эритроцитах новорожденных животных, находившихся в среде с повышенным содержанием кислорода, через 14 сут снижается активность каталазы, Г6фДГ и ферментов, участвующих в метаболизме глутатиона (ГП и ГР), и увеличивается содержание ТБК-активных продуктов. Этот факт подтверждается изменением такого важного показателя функциональной способности эритроцитов, как осмотическая резистентность клеточной мембраны (ОРЭ) (таблица 2). У здоровых животных в растворе с концентрацией 0,45% NaCl разрушалось 23,71% эритроцитов. После двухнедельной инкубации новорожденных в условиях гипероксии в растворе с концентрацией 0,45% NaCl разрушалось уже 86,39% всего эритроцитарного пула, что свидетельствует об очень низкой устойчивости эритроцитарной мембраны.

Ингаляционное введение липосом, содержащих N-ацетилцистеин, привело к нормализации активности ферментов, которые участвуют в обезвреживании супероксидного радикала (активность СОД увеличилась в 1,2 раза по сравнению с группой «гипероксия», $p < 0,05$) и перекиси водорода (активность каталазы возросла по сравнению с группой «гипероксия» в 2,6 раза, $p < 0,05$).

В эритроцитах животных, находившихся в условиях гипероксии 14 сут и получавших ингаляционно N-АЦ, наблюдаются изменения в системе «глутатион–глутатионзависимые ферменты». После введения N-АЦ возрастает активность ГР в 1,4 раза ($p < 0,05$). Возможно, этому способствует увеличение концентрации восстановленного НАДФ⁺, который является коферментом в данной реакции. Образование высоких концентраций НАДФН·Н⁺ может быть результатом высокой активности Г6фДГ. После введения N-АЦ активность этого фермента увеличилась в 1,4 раза ($p < 0,05$) не только по сравнению с группой животных, которые получали N-АЦ, но и по сравнению с контрольной группой (таблица 1). ГР катализирует восстановление глутатиона. Как следствие высокой активности фермента наблюдается выраженная тенденция к увеличению содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах новорожденных морских свинок.

Содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах новорожденных животных, получавших липосомы с N-ацетилцистеином, снизилось в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «гипероксия» и достоверно не отличалось от контроля (таблица 2).

Заключение. В эритроцитах новорожденных морских свинок, находившихся в среде с повышенным содержанием кислорода в течение 14 сут, снижается активность каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Недостаточность антиоксидантных систем ведет к накоплению в эритроцитах ТБК-активных продуктов и снижению осмотической резистентности этих клеток. Ингаляционное введение мультиламеллярных липосом с N-АЦ увеличивает активность ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталазы, ГР и Г6фДГ), снижает содержание ТБК-активных продуктов и увеличивает осмотическую резистентность эритроцитов, что свидетельствует о повышении их устойчивости к повреждениям, которые вызваны длительным воздействием гипероксии.

Литература

1. Шишко, Г.А. Современные подходы к ранней диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии: учеб.-метод. пособие для врачей. — Минск: БелМАПО, 2006. — 32 с.
2. Pulmonary outcome at 1 year corrected age in premature infants treated at birth with recombinant human CuZn superoxide dismutase / J.M. Davis [et al.] // *Pediatr.* — 2003. — Vol. 111, № 3. — P. 469–476.
3. N-acetylcysteine does not prevent bronchopulmonary dysplasia in immature infants: a randomized controlled trial / T. Ahola [et al.] // *J. Pediatr.* — 2003. — Vol. 143, № 6. — P. 713–719.
4. Randomised controlled trial of oral vitamin A supplementation in preterm infants to prevent chronic lung disease / S.P. Wardle [et al.] // *Arch. Dis. in Childhood.* — 2001. — Vol. 84, № 1. — P. 9–13.
5. Effect of N-acetylcysteine on the matrix metalloproteinases and their inhibitors in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity / N. Kamalakkannan [et al.] // *J. Food Sci. Nutr.* — 2009. — Vol. 14. — P. 14–20.
6. Suntres, Z.E. Liposomal antioxidants for protection against oxidant-induced damage / Z.E. Suntres // *J. Toxicol.* — 2011. — Aug. 16. — id.152474, 16 p.
7. Liposomal antioxidants provide prolonged protection against acute respiratory distress syndrome / J. Fan [et al.] // *Surg.* — 2000. — Vol. 128, № 2. — P. 332–338.

USE OF LIPOSOMES CONTAINING N-ACETYLCYSTEINE FOR CORRECTION OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN ERYTHROCYTES IN EXPERIMENTAL HYPEROXIA

Rutkovskaya Zh.A., Kotovich I.L.

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

Mechanical ventilation is widely used to maintain high levels of partial oxygen pressure in the blood of preterm infants that is necessary for the development of lung tissue and adequate gas exchange. However, oxygen is a powerful oxidizing agent and a source of free radicals, which suggests the development of «oxidative stress» that in preterm newborns occurs against a background of deficient antioxidant systems. This is one of the factors contributing to the lung tissue damage and development of bronchopulmonary dysplasia, retinopathy, cerebral hemorrhage. Inhaled multilamellar liposomes containing N-acetylcysteine caused increase in activity of antioxidant enzymes, reduced the content of TBA-reactive products and increased the osmotic resistance of red blood cells, which indicates an increase in their resistance to damage caused by prolonged exposure to hyperoxia.

Keywords: newborn guinea pigs, hyperoxia, antioxidant enzymes, TBA-reactive products, N-acetylcysteine.

Поступила 13.05.2016