КОРРЕКЦИЯ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА СУРФАКТАНТА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОДНОЙ И ЛИПОСОМНОЙ ФОРМ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА

И.Л. Котович, Ж.А. Рутковская, А.Д. Таганович

Белорусский государственный медицинский университет

Сурфактантной системе принадлежит важная роль в обеспечении нормального функционирования легких. Поверхностно-активные компоненты сурфактанта препятствуют спадению альвеол, обеспечивают газообмен, оказывают ряд иммуномодулирующих эффектов. Недостаточность сурфактанта у недоношенных новорожденных, наряду с искусственной вентиляцией, токсическим действием высоких концентраций кислорода и недостаточностью антиоксидантов, способствует повреждению легких и развитию бронхолегочной дисплазии. Известно, что дефицит сурфактанта стимулирует фиброгенез [1], что сопровождается формированием необратимых структурно-функциональных нарушений в легких. Использование сурфактантной терапии позволяет существенно улучшить состояние новорожденных с признаками респираторного дистресса, хотя преимущества и недостатки разных средств, их дозировка и интервал введения, а также длительность такой терапии служат предметом дискуссий. Актуальной задачей современных исследований является изучение возможности коррекции состава сурфактанта и защиты легких новорожденных от токсического действия кислорода с помощью фармацевтических средств.

Цель работы — изучение влияния водной и липосомной форм N-ацетилцистеина при их ингаляционном введении на содержание фосфолипидов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости новорожденных морских свинок, подвергавшихся гипероксии.

Материал и методы. В эксперименте использовались новорожденные морские свинки, находившиеся на стандартном рационе вивария БГМУ. Животных опытных групп подвергали гипероксии (концентрация кислорода не менее 70%) в течение 3-х и 14-ти сут. Контрольные животные дышали обычным воздухом. Каждая экспериментальная группа включала 8–10 животных. Препараты N-ацетилцистеина вводили ингаляционно с помощью компрессорного небулайзера (Omron, Китай) 1 раз в два дня. В группах, в которых использовали водный раствор, ингаляционная смесь содержала N-ацетилцистеин (20% раствор для ингаляций, Белмедпрепараты, РБ) из расчета 250 мг/кг и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4. В группах, в которых использовали липосомную форму препарата, ингаляционно вводили свежеприготовленную смесь мультиламеллярных липосом, содержащих N-ацетилцистеин (250 мг/кг), L-α-дипальмитоилфосфатидилхолин (Sigma, США) (50 мг/кг), и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4. Для приготовления липосом применяли стандартный метод механического диспергирования. По окончании эксперимента животных наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально) и получали материал для исследования не ранее, чем через 22 ч после последнего введения препарата. Материалом для исследования являлся бесклеточный супернатант бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Фракционирование фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии с последующим количественным учетом по уровню липидного фосфора. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0. Для сравнения выборок, распределение которых было отличным от нормального, применяли непараметрический критерий Манна–Уитни (U-тест). Различия считали достоверными при уровне значимости $p<0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (25–75 процентиль).

Результаты и их обсуждение. При воздействии гипероксии в течение 3-х сут было обнаружено достоверное увеличение содержания фосфатадилхолина (ФХ), динасыщенного фосфатидилхолина (ДНФХ) и общего липидного фосфора (ОЛФ) в БАЛЖ (на 98, 115 и 82% соответственно, $p<0,05$) (таблица). Dombrowsky H. et al. [2] изучали синтез фосфатидилхолина в легких крыс в условиях гипероксии (85%) и обнаружили, что в период между 2 и 7-ми сут воздействия он усиливается примерно в 1,7 раза, что согласуется с нашими результатами. Однако по мере увеличения длительности гипероксии включение фосфатидилхолина в состав сурфактанта и его секреция в альвеолярное пространство не увеличивались, а наоборот, прогрессивно снижались [2]. При этом нарушались и функциональные характеристики сурфактанта.

В нашем исследовании также при увеличении длительности гипероксии обращала на себя внимание тенденция к прогрессирующему снижению уровня основных фосфолипидных фракций и общего липидного фосфора в БАЛЖ. У животных, подвергавшихся гипероксии в течение 14 сут, содержание фосфатидилхолина уменьшилось, в среднем в 3,2 раза по сравнению с контролем ($p<0,05$). Другие фракции фосфолипидов либо не определялись вовсе (как лизофосфатидилхолин и сфингомиелин), либо обнаруживались в незначительных количествах (фосфатидилэтаноламин, 20% от контроля).

Таблица

Влияние водной и липосомной форм N-ацетилцистеина на содержание фосфолипидов в БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергавшихся гипероксии

Показатель	Группа		Без коррекции	+ N-АЦ$_{водный}$	+ N-АЦ$_{липосомный}$
ЛизоФХ	3 сут	контроль	18,45 (4,07–29,61)	22,03 (19,79–23,74)	30,00 (18,00–78,46)
		гипероксия	0 (0–39,75)	22,95 (20,49–25,47)	26,93 (15,92–37,95)
	14 сут	контроль	55,40 (19,41–70,69)	44,00 (22,70–47,00)	37,41 (24,28–50,53)
		гипероксия	0 (0–20,12)*	19,65 (13,23–26,07)	9,75 (0–38,34)
СМ	3 сут	контроль	11,34 (1,02–39,73)	49,87 (34,53–65,22)*	23,13 (18,27–58,13)
		гипероксия	11,04 (0–17,55)	3,00 (0–9,00)	18,86 (10,61–27,11)
	14 сут	контроль	74,52 (0–123,97)	39,84 (23,81–55,86)	72,66 (65,92–79,41)
		гипероксия	0 (0–12,76)*	90,15 (73,86–101,26)^	0 (0–6,49)*
ФЭА	3 сут	контроль	97,95 (60,61–142,55)	115,38 (49,48–181,29)	175,43 (164,49–186,36)*
		гипероксия	97,22 (57,82–181,85)	124,99 (110,99–134,50)	141,93 (122,00–161,86)
	14 сут	контроль	190,55 (84,12–458,79)	156,28 (50,13–358,0)	143,57 (93,69–243,50)
		гипероксия	37,47 (0–100,53)*	147,72 (81,35–169,98)^	292,72 (231,78–316,24)$^{\wedge, 4–5}$
ДНФХ	3 сут	контроль	220,23 (121,68–301,15)	232,35 (120,60–321,20)	400,57 (323,73–436,40)*
		гипероксия	473,65 (352,42–513,12)*	373,23 (306,15 – 421,30)	320,56 (267,32–330,34)^
	14 сут	контроль	811,12 (703,56–920,43)	496,78 (392,44–540,20)*	612,12 (509,23–680,78)*
		гипероксия	295,15 (209,32 – 326,12)*	655,13 (613,68–725,34)^	1204,64 (922,65–1540,32)*$^{\wedge, 4–5}$
ФХ сумм.	3 сут	контроль	406,29 (293,50–514,66)	424,52 (287,87–561,16)	556,36 (498,06 – 614,66)
		гипероксия	805,03 (598,21–978,39)*	621,50 (577,05–811,50)	427,42 (393,12–461,72)^
	14 сут	контроль	1300,42 (921,60–1645,61)	778,00 (550,38–1005,61)*	1027,85 (936,71–1119,00)
		гипероксия	405,18 (311,17–749,25)*	970,29 (970,29–1189,87)^	1728,78 (1681,53–2145,63)*$^{\wedge, 4–5}$
ОЛФ	3 сут	контроль	538,14 (388,25–780,29)	611,82 (425,06–798,58)	824,30 (680,83–967,77)
		гипероксия	981,39 (898,24–1235,19)	704,03 (676,50–977,03)	615,16 (580,19–650,12)^
	14 сут	контроль	1841,63 (932,47–2293,57)	887,62 (642,99–1132,25)*	1231,62 (1124,05–1339,19)
		гипероксия	539,29 (443,38–1016,19)*	1238,88 (675,05–1602,17)^	1998,90 (1984,01–2461,87)^

Примечания (содержание фосфолипидов представлено в нмоль фосфора/мг белка):

1 — ЛизоФХ — лизофосфатидилхолин, СМ — сфингомиелин, ФЭА — фосфатидилэтаноламин, ДНФХ — динасыщенный фосфатидилхолин, ФХ сумм. — суммарная фракция фосфатидилхолина, ОЛФ — общий липидный фосфор, N-АЦ — N-ацетилцистеин.

2 — *$p<0,05$ по сравнению с соответствующей группой «контроль»; ^$p<0,05$ по сравнению с соответствующей группой «гипероксия»; $^{4–5}$ — $p<0,05$ по сравнению с соответствующей группой «+ N-АЦ$_{водный}$».

Возможной причиной резкого уменьшения содержания фосфолипидов в бронхоальвеолярном пространстве в условиях длительной гипероксии представляется окислительное повреждение компонентов сурфактанта. В пользу данного предположения свидетельствует увеличение доли продуктов перекисного окисления липидов в БАЛЖ, которое имеет место при действии гипероксии [3]. Нельзя исключить также повреждающего действия кислорода на клетки-продуценты сурфактанта — альвеолоциты II типа.

В результате ингаляционного введения водного раствора N-ацетилцистеина на фоне непродолжительной гипероксии (3 сут) была выявлена тенденция к нормализации уровня ФХ, ДНФХ и ОЛФ в БАЛЖ. На фоне

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ

продолжительной гипероксии (14 сут) введение N-ацетилцистеина сопровождалось достоверным изменением содержания ФХ (в т. ч. ДНФХ), сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина, их уровень в БАЛЖ увеличивался и не отличался от контрольных значений. По нашему мнению, увеличение содержания сурфактантных фосфолипидов в БАЛЖ при введении N-ацетилцистеина на фоне длительной гипероксии может быть результатом реализации нескольких механизмов. Во-первых, собственно антиоксидантного действия препарата и подавления окислительного повреждения компонентов сурфактанта. Во-вторых, торможения апоптоза альвеолоцитов II типа [4] и стимуляцией секреции компонентов сурфактанта этими клетками под влиянием N-ацетилцистеина [5].

Уровень фосфолипидов (суммарного ФХ, ДНФХ и общего липидного фосфора) в БАЛЖ животных при введении липосомной формы N-ацетилцистеина на фоне непродолжительной гипероксии (3 сут) был ниже, чем в группе без коррекции в 1,5–1,9 раза ($p<0,05$), при этом достоверные отличия с группой сравнения отсутствовали. При введении липосом с N-ацетилцистеином на фоне длительной гипероксии (14 сут) отмечалось значительное увеличение уровня фосфолипидов в БАЛЖ по сравнению с группой животных, подвергавшихся действию изолированной гипероксии. Содержание общего липидного фосфора возрастало в 3,7 раза ($p<0,05$ по сравнению с группой «гипероксия»), повысилось содержание фосфатидилэтаноламина (разница с группой «контроль 14 сут» недостоверна), а фракции ДНФХ и суммарного ФХ даже превысили показатели группы сравнения в 1,5 и 1,3 раза соответственно ($p<0,05$). Помимо эффекта «заместительной терапии», обусловленной содержанием дипальмитоилфосфатидилхолина в составе липосом, это может быть связано с пролонгированием действия N-ацетилцистеина и увеличения его концентрации в легких. Ингаляционное введение водного раствора N-ацетилцистеина (250 мг/кг) в условиях длительной гипероксии способствует нормализации фосфолипидного состава сурфактанта в БАЛЖ. При использовании липосомной формы N-ацетилцистеина на фоне длительной гипероксии уровень основных фракций фосфолипидов в БАЛЖ также увеличивается, при этом содержание фосфатидилхолина превышает контрольные значения.

CORRECTION OF SURFACTANT PHOSPHOLIPID COMPOSITION WITH AQUEOUS AND LIPOSOMAL FORMS OF N-ACETYLCYSTEINE IN EXPERIMENTAL HYPEROXIA

I.L. Katovich, Zh.A. Rutkovskaya, A.D. Tahanovich

Inhaled N-acetylcysteine normalized the BALF phospholipid content in hyperoxia-exposed newborn guinea pigs. Whether aerosolized N-acetylcysteine can be used to prevent lung injury and development of bronchopulmonary dysplasia in humans, needs further research.

Литература

1. 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.

2. Molecular and functional changes of pulmonary surfactant in response to hyperoxia / H. Dombrowsky [et al.] // Pediatr. Pulmonol. — 2006. — Vol. 41, № 11. — P. 1025–1039.

3. Рутковская, Ж.А. Окислительная модификация липидов и белков в легких и плазме крови новорожденных морских свинок в динамике гипероксии / Ж.А. Рутковская, И.Л. Котович, А.Д. Таганович // Мед. журн. — 2012. — № 2. — С. 97–102.

4. Lung injury caused by high tidal volume mechanical ventilation and hyperoxia is dependent on oxidant mediated c-Jun NH2-terminal kinase activation / P.S. Makena [et al.] // J. Appl. Physiol. — 2011. — Vol. 111, № 5. — P. 1467–1476.

5. Effect of N-acetylcysteine treatment on NO2-impaired type II pneumocyte surfactant metabolism / B. Muller [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 31, № 2. — P. 179–188.