

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕТИНОИДОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ ПРОТЕАЗЫ/АНТИПРОТЕАЗЫ В ЛЕГКИХ МОРСКИХ СВИНОК В ДИНАМИКЕ ГИПЕРОКСИИ

Котович И.Л.,

*к.м.н., доцент кафедры биологической химии,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

Рутковская Ж.А.,

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
к.м.н., доцент кафедры биологической химии*

Таганович А.Д.,

*д.м.н, профессор, зав. кафедрой биологической химии,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

Дубейко А. В.,

*студент 2-го курса,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
, Минск, Беларусь*

Ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом уменьшает интенсивность протеолитических процессов в легких новорожденных морских свинок в условиях длительной гипероксии за счет уменьшения соотношения «эластаза/альфа-1-протеазный ингибитор» и увеличения уровня коллагена в легких.

Ключевые слова: гипероксия; протеазы; коллаген; ретиноиды

THE USE OF RETINOIDS TO CORRECT CHANGES IN THE PROTEASE/ANTIPROTEASE SYSTEM IN THE LUNGS OF GUINEA PIGS IN HYPEROXIA

Katovich I.L.,

*candidate of medical sciences,
associate professor of the department of biological chemistry*

Rutkovskaya Zh.A.,

*candidate of medical sciences,
associate professor of the department of biological chemistry*

Tahanovich A.D.,

*doctor of medical sciences, professor, head of the department
of biological chemistry,*

Dubeyko A. V.,

2nd year student,

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Inhaled administration of retinoids incorporated in liposomes reduces the intensity of proteolytic processes in the lungs of newborn guinea pigs under conditions of prolonged hyperoxia by reducing the ratio of "elastase / alpha-1-protease inhibitor" and increasing the level of collagen in the lungs.

Key words: *hyperoxia; proteases; collagen; retinoids*

Респираторный дистресс-синдром (РДС) — одна из серьезных проблем, с которой приходится сталкиваться врачам, выхаживающим недоношенных младенцев, рожденных на сроке менее 37 недель беременности. Незрелость легочной ткани требует проведения искусственной вентиляции легких (ИВЛ) [2]. Использование ИВЛ и высоких концентраций кислорода на фоне незрелости антиоксидантной системы новорожденных и дефицита сурфактанта приводит к микроциркуляторным нарушениям в легочной ткани, формированию воспалительной реакции и фиброзированию пораженных участков легких. В результате использования ИВЛ у 16-40% новорожденных развивается бронхолегочная дисплазия (БЛД) [3]. Эффективные способы предотвращения развития БЛД в настоящее время отсутствуют, в связи с этим актуальной задачей является изучение возможности коррекции метаболических нарушений в легких, вызванных гипероксией.

Витамин А играет важную роль в процессах развития и репарации легких. Помимо антиоксидантного действия, ретиноиды принимают участие в развитии иммунологического и воспалительного ответа за счет регуляции синтеза цитокинов и факторов роста на уровне транскрипции [4]. Энтеральное введение витамина А для профилактики БЛД у недоношенных оказалось не эффективным [6]. При внутримышечном введении высоких доз витамина А новорожденным с экстремально низкой массой тела при рождении было отмечено некоторое уменьшение частоты развития БЛД и процента смертельных случаев [1].

Одним из способов, повышающим эффективность препаратов, считается их включение в липосомы, что облегчает проникновение веществ в клетки и увеличивает продолжительность их действия. При заболеваниях легких липосомы могут быть эффективным средством доставки веществ к клеткам альвеолярного эпителия. Ингаляционное введение ретиноидов ранее не применялось.

Цель настоящего исследования: изучить влияние ретиноидов, включенных в состав липосом на содержание коллагена, нейтрофильной эластазы и активность альфа1-протеиназного ингибитора в легких новорожденных морских свинок в динамике гипероксии.

Материалы и методы: в эксперименте использовали новорожденных морских свинок, которые находились на стандартном рационе вивария УО «БГМУ».

Были сформированы четыре группы наблюдения: «контроль», «контроль + ретиноиды», «гипероксия», «гипероксия + ретиноиды». Животных опытных групп в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70%. Длительность наблюдения составляла 3 и 14 суток. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. В каждой экспериментальной группе находилось 4-5 животных.

Для ингаляционного введения препарата использовали компрессорный небулайзер Comp Air (NE-C28-E, Omron, Китай). Ингаляции проводили 1 раз в два дня, всего дважды в течение 3 суток и 7 раз в течение 14 суток воздействия гипероксии.

Для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь мультиламеллярных липосом, содержащих ретинол (6 мг/кг), ретиноевую кислоту (0,6 мг/кг), ДПФХ (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4.

По окончании эксперимента животных наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально) и получали материал для исследования не ранее чем через 22 часа после последнего введения препарата.

В качестве материала для исследования использовали гомогенат легких.

Содержание нейтрофильной эластазы определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием набора реагентов фирмы USCN Life Science Inc. (Китай). Содержание эластазы в гомогенатах выражали в пг/мг белка/г ткани.

Активность альфа1-протеиназного ингибитора (А1-ПИ) определяли спектрофотометрическим методом, предложенным В.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной. Метод основан на торможении аргинин-эстеразной активности трипсина с использованием N- α -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ) в качестве субстрата. Активность А1-ПИ выражали в ингибиторных единицах (МИЕ/мг белка/г ткани).

Для *определения содержания коллагена* в гомогенатах легких использовали метод 24-часовой экстракции его кислыми растворителями после предварительного удаления примесей растворимых неколлагеновых белков. Содержание коллагена в гомогенатах выражали в мкг/г ткани/сутки.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8,0. Сравнение выборок, распределение которых было отличным от нормального, проводили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни (U-тест).

Результаты исследования. Кратковременное (3 суток) воздействие гипероксии не оказало влияния на содержание нейтрофильной эластазы в легких новорожденных животных (результаты представлены в таблице). Повреждающий эффект эластазы в тканях может сдерживаться рядом ингибиторов, главным из которых является А1-ПИ. Активность А1-ПИ в легких была достоверно повышена в 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем через 3 суток после воздействия гипероксии, что, вероятно, и препятствовало увеличению содержания эластазы в ткани легкого.

При увеличении продолжительности воздействия высоких концентраций кислорода до 14 суток активность А1-ПИ оставалась высокой, но не увеличилась по сравнению с группой животных, которые подвергались непродолжительной гипероксии (3 суток). Содержание эластазы в легких животных в эти сроки достоверно увеличилось и превысило контрольные значения в 3 раза ($p < 0,05$).

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, сдерживающих увеличение активности А1-ПИ в легких при длительном воздействии высоких концентраций кислорода. 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. Как известно из литературы, в условиях гипероксии окислительная модификация белков усиливается. Этому способствует усиление продукции активных форм кислорода. Другой причиной, может быть протеолитическое расщепление молекул А1-ПИ, так как в зоне воспаления увеличивается активность металло- и сериновых протеаз, которые продуцируются нейтрофилами и макрофагами в легких. Недостаточность ингибиторов протеаз в легких может быть не только причиной развития деструктивных процессов, характерных для бронхолегочной дисплазии, но и определять течение и прогноз данного заболевания в целом.

Таблица. - Влияние ретиноидов в составе липосом на активность альфа1-протеиназного ингибитора, содержание нейтрофильной эластазы и коллагена в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

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	544,7

			(564,9 – 809,4)*	(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 – здесь и далее в таблицах: * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «контроль без коррекции», ^ - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «гипероксия без коррекции».

Повреждения в системе протеазы-антипротеазы должно отражать наличие повреждений в белковых структурах легких в условиях гипероксии.

Для подтверждения мы определили содержание коллагена, который является основной мишенью для эластазы. Полученные данные показали, что на 14-е сутки содержание коллагена в легких опытных животных уменьшилось в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Введение ретиноидов в группе «гипероксия 14 суток» не привело к достоверному увеличению активности А1-ПИ 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 уменьшилось содержание нейтрофильной эластазы в 4,5 раза ($p < 0,05$) в ткани легких новорожденных морских свинок, подвергшихся воздействию длительной гипероксии.

Восстановление баланса в системе «протеазы-антипротеазы» должно предотвращать деструктивные повреждения легочной ткани. Подтверждением этому является выявленное нами увеличение содержания коллагена в гомогенате легкого более чем в 2,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «гипероксия 14 суток».

Противовоспалительное действие витамина А связывают с регуляцией продукции провоспалительных медиаторов и хемокинов [4]. По нашим данным ретиноиды не оказали выраженного на активность А1-ПИ, однако, в целом соотношение «эластаза/А1-ПИ» уменьшалось, при этом увеличивалось содержание коллагена в легких. Можно заключить, что при введении витамина А происходит подавление протеолитических процессов в легких. Кроме того, известно, что ретиноиды являются индукторами синтеза эластина и коллагена [5]. Этим может объясняться тот факт, что уровень коллагена у опытных животных с коррекцией ретиноидами был выше, чем у контрольных животных.

Таким образом, ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом уменьшает интенсивность протеолитических процессов в легких новорожденных морских свинок в условиях длительной гипероксии за счет уменьшения соотношения «протеазы/антипротеазы» и увеличения уровня коллагена в легких.

Список литературы

1. Ambalavanan, N. Vitamin A supplementation for extremely low birth weight infants: outcome at 18 to 22 months / N. Ambalavanan, J.E. Tyson, K.A. Kennedy [et al.] // *Pediatrics*. – 2005. – Vol.115, No. 3. – P. e249-e254
2. Blennow M, Bohlin K: Surfactant and noninvasive ventilation. *Neonatology* 107(4):330–336, 2015.
3. De Dooy, J.J. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates / J.J. De Dooy, L.M. Mahieu, H.P. van Bever // *Eur. J. Pediatr.* – 2001. – Vol. 160. – P. 457-463
4. James, M.L. Vitamin A and retinoid acid act synergistically to increase lung retinyl esters during normoxia and reduce hyperoxic lung injury in newborn mice / M.L. James, A.C. Ross, A. Bulger [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2010. – Vol. 67 (6). – P. 591-597
5. Pierce, R.A. Retinoids increase lung elastin expression but fail to alter morphology or angiogenesis genes in premature ventilated baboons / R.A. Pierce, B. Joyce, S. Officer [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2007. – Vol. 61 (6). – P. 703-709
6. Wardle, S.P. Randomised controlled trial of oral vitamin A supplementation in preterm infants to prevent chronic lung disease / S.P. Wardle, A. Hughes, S. Chen [et al.] // *Arch. Disease in Childhood*. – 2001. – Vol. 84 (1). – P. F9-F13