

Р.М. Саттаров, А.С. Матюхевич

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И ТОКОФЕРОЛА
ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО
РАВНОВЕСИЯ В ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ,
ВЫЗВАННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИЕЙ**

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

Кафедра биологической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

R.M. Sattarov, A.S. Matyuhevich

**USE OF N-ACETYLCYSTEINE AND TOCOPHEROL FOR CORRECTION
OF CHANGES IN OXIDANT-ANTIOXIDANT EQUILIBRIUM IN THE LUNGS
OF NEWBORN ANIMALS CAUSED BY EXPERIMENTAL HYPEROXIA**

Tutor: associate professor Zh.A. Rutkovskaya

Department of Biological Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Альфа-токоферол и N-ацетилцистеин нормализуют состояние оксидантно-антиоксидантного равновесия в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии.

Ключевые слова: новорожденные морские свинки, альфа-токоферол, N-ацетилцистеин, гипероксия.

Resume. Alpha-tocopherol and N-acetylcysteine normalize the state of oxidant-antioxidant balance in the lungs of newborn guinea pigs under conditions of hyperoxia.

Keywords: newborn guinea pigs, alpha-tocopherol, N-acetylcysteine, hyperoxia.

Актуальность. У недоношенных новорожденных, подвергавшихся оксигенотерапии, значительно снижается качество жизни ввиду развития бронхолегочной дисплазии (БЛД). Важнейшими факторами патогенеза данного полиэтиологического хронического заболевания морфологически незрелых структур легких являются воздействие высоких концентраций кислорода и недостаточность антиоксидантной системы.

При проведении оксигенотерапии происходит генерация активных форм кислорода (АФК), которые индуцируют превращение молекул тканей дыхательной системы в токсические вещества и оказывают прямое повреждающее действие на альвеолциты и эндотелий. Другой причиной развития БЛД является дефицит антиоксидантных систем. Антиоксидантная система включает в себя ферменты, инактивирующие свободные радикалы, такие как глутатионпероксидаза, каталаза и супероксиддисмутаза, так и неферментные антиоксидантные факторы (витамины А, Е). У недоношенных детей концентрация данных веществ низкая, поскольку развитие антиоксидантной системы происходит в течение третьего триместра беременности и, следовательно клеточные структуры легких плохо защищены от воздействия активных форм кислорода [6].

Поэтому коррекция изменений оксидантно-антиоксидантного равновесия при гипероксии и разработка методов предотвращения повреждения легочной ткани у новорожденных являются актуальными проблемами. Взяв за основу патогенетический

принцип лечения заболеваний, будет оправданно предположить, что использование антиоксидантов будет способствовать предотвращению или уменьшению деструктивных процессов в легких. Витамин Е, являясь антиоксидантом, стабилизирует клеточные мембраны и обеспечивает нормальное течение биохимических процессов, поэтому недостаточное содержание токоферолов в организме приводит к формированию различных проявлений так называемой мембранной патологии [4]. В клинической практике лечения заболеваний дыхательной системы также используется N-ацетилцистеин, антиоксидантное действие которого связано как с прямым взаимодействием с окислителями (за счет тиольной группы), так и с участием в синтезе глутатиона [2].

Цель: изучить действие альфа-токоферола и N-ацетилцистеина на оксидантно-антиоксидантное равновесие в легких новорожденных животных со смоделированной гипероксией.

Задачи:

1. Провести оценку влияния альфа-токоферола и N-ацетилцистеина на содержание антиоксидантов (альфа-токоферол, SH-содержащие соединения, глутатионпероксидаза) в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) и легких новорожденных животных в условиях гипероксии.

2. Определить влияние альфа-токоферола и N-ацетилцистеина на содержание продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в БАЛЖ новорожденных животных в условиях гипероксии.

Материалы и методы. Исследование проводилось в соответствии с нормами биомедицинской этики. В эксперименте использовались новорожденные морские свинки, из которых было сформировано 6 групп: первая группа – контрольная – потреблявшая обычный воздух, вторая – животные, подвергавшиеся гипероксии, третья – потреблявшие обычный воздух животные, получавшие альфа-токоферол, четвертая – животные, получавшие альфа-токоферол во время гипероксии, пятая - потреблявшие обычный воздух животные, получавшие N-ацетилцистеин, шестая - животные, получавшие N-ацетилцистеин во время гипероксии. В каждой экспериментальной группе находилось 4-5 животных.

Создание условий гипероксии проводили следующим образом. Морские свинки опытных групп в течение суток после рождения помещались в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70%. Длительность воздействия гипероксии составляла 3 и 14 суток. Введение препаратов осуществлялось с использованием компрессорного небулайзера Comr Air. Для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь мультиламеллярных липосом, содержащих N-ацетилцистеин (250 мг/кг), L- α -дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) (50 мг/кг), и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4 или свежеприготовленную смесь мультиламеллярных липосом, содержащих α -токоферол (12,5 мг/кг), ДПФХ (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4. Ингаляции проводили 1 раз в двое суток.

По окончании эксперимента животных наркотизировали тиопенталом натрия (15 мг/кг) и для исследования получали бесклеточный супернатант БАЛЖ, в котором

определяли активность глутатионпероксидазы (ГП), содержание восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений, токоферола, а также содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты), диеновых конъюгатов (ДК), оснований Шиффа (ОШ) и карбонильных производных белков.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0. Анализ осуществлялся с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и непараметрического U-теста Манна-Уитни для независимых выборок. Значения коэффициентов считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. У новорождённых морских свинок непродолжительное воздействие гипероксии в течение 3 суток привело к снижению содержания токоферола в ткани легкого в 1,7 раза. Эти изменения сохранялись и при увеличении сроков воздействия гипероксии до 14 суток. Ингаляция липосом с токоферолом привела к достоверному увеличению содержания токоферола в ткани легких в 2 раза при длительном воздействии гипероксии. Липосомы с N-ацетилцистеином не оказали влияния на уровень витамина E в легких.

Активность ГП статистически значимо снижалась в группах, подвергавшихся воздействию гипероксии в течение 3 и 14 суток. В литературе имеются данные об индукции синтеза ГП на уровне транскрипции в условиях гипероксии, однако, как следует из приведенных данных, это не сопровождается ростом активности ГП в БАЛЖ. Снижение активности ГП, несмотря на усиление ее синтеза, может быть обусловлено повреждением молекул фермента вследствие окислительной модификации или протеолитического расщепления [3].

Введение липосом с токоферолом увеличило активность ГП в 4 раза по сравнению с группой «гипероксия». Липосомы с N-АЦ также способствовали повышению активности этого фермента, но в меньшей степени (активность ГП возросла в 2 раза). Полученные данные согласуются с литературными данными. Как известно, витамин E способствует включению селена в состав активного центра глутатионпероксидазы и является индуктором синтеза данного фермента [4]. В литературе указывается, что N-ацетилцистеин не способен противодействовать неблагоприятному влиянию пероксида водорода, супероксид аниона, но эффективен против действия радикалов оксида азота и гипогалогеновых кислот [1].

Спустя 3 суток воздействия гипероксии концентрация SH-соединений в БАЛЖ достоверно не отличалась от контроля и даже имела тенденцию к росту, что рассматривают как компенсаторную защитную реакцию. При увеличении продолжительности гипероксии до 14 суток содержание небелковых SH-соединений в БАЛЖ новорожденных морских свинок снизилось и составило 68% от контроля.

Ингаляционное введение липосом, содержащих N-ацетилцистеин, приводило к увеличению небелковых SH-соединений в 1,3 раза. По мнению ряда авторов, N-ацетилцистеин способен пополнять пул глутатиона при его истощении, параллельно осуществляя функции прямого антиоксиданта для некоторых соединений [1].

У животных, которые получали ингаляции с липосомами, содержащими α -токоферол, на фоне длительной гипероксии также увеличилось содержание восстановленного глутатиона. Известно, что витамин Е является индуктором ферментов синтеза глутатиона, тем самым, повышение уровня токоферола в легких закономерно привело к повышению концентрации SH-групп.

Основное действие АФК направлено на индукцию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, повреждение мембраносвязанных белков, ферментов и ДНК клеток.

Уровень первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) в БАЛЖ опытных животных достоверно увеличивался на 3-и сутки воздействия гипероксии (в среднем, в 3 раза), а на 14-е сутки их содержание составил 168% от контроля ($p < 0,05$). Введение липосом с N-ацетилцистеином приводили к достоверному снижению концентрации диеновых конъюгатов в БАЛЖ в 2,8 раза при продолжительном воздействии гипероксии.

За 14 суток воздействия гипероксии концентрация продуктов, взаимодействующих с ТБК, достоверно увеличилась в 1,9 раза. Токоферол и N-ацетилцистеин в составе липосом корректируют уровень ТБК-активных продуктов примерно с одинаковой эффективностью. Токоферол снижает уровень ТБК-активных продуктов в 2,1 раза, а препарат N-ацетилцистеина - в 1,9 раза. Это действие может быть основано как на прямой антиокислительной активности препаратов (тиольная группа N-ацетилцистеина способна связывать альдегидную группу малонового диальдегида, а антиоксидантные свойства токоферола обусловлены также способностью подвижного гидроксила хроманового ядра его молекулы непосредственно взаимодействовать со свободными радикалами кислорода, ненасыщенных жирных кислот и липоперекисями [7]), так и на способности обоих препаратов увеличивать активность системы глутатион/глутатионзависимые ферменты.

Воздействие длительной гипероксии привело к появлению в БАЛЖ оснований Шиффа (ОШ). Основания Шиффа — конечный продукт окисления липидов и белков, образуются в результате взаимодействия малонового диальдегида с белками. Увеличение параметров оснований Шиффа подтверждает тенденцию к хронизации процесса активации окисления липидов и белков. [5]. Поэтому повышение их уровня следует расценивать не только как стимуляцию процессов перекисного окисления липидов, но и как повреждение других макромолекул клетки. N-Ацетилцистеин в составе липосом приводил к статистически значимому снижению содержания ОШ в 9 раз. Токоферол в 1,7 раза снижает уровень ОШ. Препарат токоферола менее эффективен, возможно это связано с тем, что при окислении α -токоферола образуются хроманокислые радикалы, способные продолжить окисление липидов [7].

Содержание карбонильных производных аминокислот в белках наиболее значительно повышалось на 3-и сутки воздействия гипероксии (в 4,5 раза по сравнению с контролем). В дальнейшем их уровень снижался и на 14-е сутки соответствовал контрольным значениям. Основными индукторами образования карбонильных производных являются АФК, поэтому увеличение их количества на 3-и сутки гипероксии вполне закономерно. Однако, модификация белков может быть индуцирована дей-

ствием не только АФК, но и продуктов липопероксидации. Окислительно модифицированные белки более подвержены протеолизу, что может быть причиной уменьшения уровня карбонильных производных в БАЛЖ при увеличении длительности гипероксии. Липосомы с токоферолом достоверно снижают содержание карбонильных производных аминокислот в 4,6 раза. Уровень карбонильных производных при коррекции N-ацетилцистеином имел тенденцию к снижению, но контрольных значений достигнуть не удалось.

Выводы:

1. По мере увеличения продолжительности действия гипероксии в легких новорожденных морских свинок уменьшается уровень ферментативных и неферментативных антиоксидантов и усиливаются процессы перекисного окисления липидов и белков.

2. Ингаляционное введение липосом, содержащих альфа-токоферол, новорожденным морским свинкам в условиях гипероксии приводит к увеличению содержания токоферола, небелковых SH-соединений, активности ГП с одной стороны и к уменьшению содержания продуктов, реагирующих с ТБК, оснований Шиффа и карбонильных производных аминокислот с другой.

3. Ингаляционное введение липосом, содержащих N-ацетилцистеин, новорожденным морским свинкам в условиях гипероксии приводит к увеличению активности ГП и содержания небелковых SH-соединений, а также к снижению содержания продуктов окислительной модификации белков в БАЛЖ новорожденных животных.

4. Альфа-токоферол и N-ацетилцистеин в составе липосом нормализуют состояние оксидантно-антиоксидантного равновесия в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии, тем самым данные препараты можно использовать для коррекции изменений оксидантно-антиоксидантного равновесия и профилактики повреждений.

Литература

1. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why / G. Aldini, A. Altomare, G. Baron [et al.] // *Free Radical Research*. – 2018. – № 52. – P. 751-762.
2. Ивашев, М. Н. Клиническая фармакология ацетилцистеина / М. Н. Ивашев, А. В. Сергиенко // *Успехи современного естествознания*. – 2013. – № 5. – С. 116-117.
3. Котович, И. Л. Коррекция оксидантно-антиоксидантного баланса в легких при гипероксии с использованием липосомных форм альфа-токоферола и ретиноидов в эксперименте / И. Л. Котович, Ж. А. Рутковская, А. Д. Таганович // *Биомедицинская химия*. – 2017. – № 63 (4). – С. 289-295.
4. Новицкий, В. В. Патолофизиология. В 2 т. Т. 1 : учебник / В. В. Новицкий, Е. Д. Гольдберг, О. И. Уразова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 848 с.
5. Особенности течения патологического процесса при рассеянном склерозе, подтвержденная динамикой биохимических маркеров окислительного стресса / М. А. Луцкий, А. М. Земсков, В. П. Савиных [и др.] // *Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова*. – 2016. – № 116 (10). – С. 21-26.
6. Павлинова, Е. Б. Бронхолегочная дисплазия: современное состояние проблемы / Е. Б. Павлинова // *Омский научный вестник*. – 2011. – № 1. – С. 37-40.
7. Характеристики некоторых препаратов с антиоксидантной активностью и их применение для лечения туберкулеза / Л. А. Шовкун, Д. А. Кудлай, Н. Ю. Николенко [и др.] // *Туберкулез и болезни легких*. – 2020. – № 98 (4). – С. 58-64.