

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДНОЙ И ЛИПОСОМНОЙ ФОРМ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ, ВЫЗВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ГИПЕРОКСИИ

*Ж.А. Рутковская*

*Белорусский государственный медицинский университет*

Использование высокой концентрации кислорода при искусственной вентиляции легких в процессе выхаживания недоношенных новорожденных является одним из факторов, провоцирующих развитие тяжелой хронической патологии – бронхолегочной дисплазии (БЛД). Эффективные способы предотвращения развития БЛД в настоящее время отсутствуют, в связи с этим изучение метаболических нарушений в легких, вызванных гипероксией, и возможности их коррекции является весьма актуальной задачей. Ранее было показано, что следствием длительного воздействия гипероксии является развитие воспалительной реакции преимущественно нейтрофильного типа и усиление протеолитических процессов за счет увеличения активности нейтрофильной эластазы и матриксных металлопротеиназ в легких [1]. Данные изменения сопровождались структурными нарушениями легочной ткани (уменьшением количества альвеол, увеличением воздушности, наличием очагов эмфиземы и истончением стенок альвеол у животных опытных групп).

Цель настоящего исследования: изучить влияние водной и липосомной форм N-ацетилцистеина (N-АЦ) на клеточный состав бронхоальвеолярной жидкости, содержание коллагена, нейтрофильной эластазы и активность  $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора в легких новорожденных морских свинок, подвергнутых воздействию гипероксии.

**Материалы и методы:** эксперименты проводили с использованием новорожденных морских свинок, которые находились на стандартном рационе вивария УО «БГМУ». Были сформированы

следующие группы наблюдения: «контроль», «контроль + N-АЦ водный», «контроль + N-АЦ липосомный», «гипероксия», «гипероксия + N-АЦ водный», «гипероксия + N-АЦ липосомный». 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 14 сут.: именно в эти сроки воздействия гипероксии ранее нами были выявлены наиболее выраженные морфологические изменения в легких. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. В каждой экспериментальной группе находилось 4–5 животных.

Изучали возможность коррекции изменений в легких, развивающихся вследствие гипероксии, с помощью ингаляционного введения N-АЦ (способы 1–2 описаны ниже). Ингаляции проводили с использованием компрессорного небулайзера (Omron, Китай) 1 раз в два дня, всего 7 раз в течение 14 сут. воздействия гипероксии. 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.

Способ коррекции 1. Ингаляционная смесь содержала N-ацетилцистеин (20% раствор для ингаляций, Белмедпрепараты, Беларусь) из расчета 250 мг/кг и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4.

Способ коррекции 2. Для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь мультиламеллярных липосом, содержащих N-ацетилцистеин (250 мг/кг), L- $\alpha$ -дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ, 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 использовали стандартную методику: спиртовой раствор ДПФХ упаривали до получения сухой липидной пленки, добавляли 20% раствор N-ацетилцистеина для ингаляций (Белмедпрепараты, Беларусь) и встряхивали на миксере Maxi-Mix 1 (Thermolyne, США) до образования однородной дисперсии. Полученные липосомы инкубировали 1 час при 40°C и использовали для приготовления ингаляционной смеси.

В качестве материала для исследования использовали бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ) и гомогенат легких. Состав клеток БАЛЖ определяли после приготовления мазков и окраски по Романовскому–Гимзе. Подсчитывали не менее 100 клеток с использованием иммерсионного объектива (увеличение 7×90). Выявлялись альвеолярные макрофаги, лимфоциты, полиморфноядерные нейтрофилы. Результат выражали в%.

Общий белок определяли по методу Lowry.

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 А1-ПИ определяли спектрофотометрическим методом, предложенным В.Ф.Нартиковой и Т.С. Пасхиной. Метод основан на торможении аргинин-эстеразной активности трипсина с использованием N- $\alpha$ -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.** У контрольных животных при введении N-ацетилцистеина выявлено увеличение концентрации общего белка в БАЛЖ (на 54%,  $p < 0,05$ , табл. 1), что, вероятно, является следствием секретолитического действия препарата. При изолированном действии гипероксии также отмечалось увеличение уровня белка в альвеолярном пространстве (на 92% в сравнении с контролем,  $p < 0,05$ ). Это может быть следствием развивающегося нейтрофильного воспаления (что подтверждается достоверным ростом общего количества клеток и относительного числа нейтрофилов в БАЛЖ) и трансудации белков плазмы крови (альбуминов).

Содержание общего белка и клеточный состав БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергавшихся воздействию гипероксии на фоне ингаляционного введения водной и липосомной форм N-ацетилцистеина

Группа	Общий белок, мкг/мл	Общее количество клеток, 10 <sup>6</sup> /мл	АМ,%	Нейтрофилы,%	Лимфоциты,%
Контроль	164,1 (113,3 – 192,5)	0,37 (0,29 – 0,54)	95,0 (95,0 – 97,5)	1,5 (0 – 2,0)	3,0 (2,0 – 4,0)
Контроль + N-АЦ водн.	252,3 (205,4 – 295,0)*	0,54 (0,50 – 0,58)	94,5 (94,0 – 95,0)	2,5 (2,0 – 3,0)	3,0 (3,0 – 3,0)
Контроль + N-АЦ липос.	218,5 (214,5 – 222,9)*	0,45 (0,36 – 0,54)	93,5 (93,0 – 94,0)	2,5 (2,0 – 3,0)	4,0 (4,0 – 4,0)
Гипероксия	314,8 (262,1 – 383,7)*	0,55 (0,40 – 0,67)*	77,5 (70,0 – 82,0)*	17,5 (15,5 – 25,0)*	4,0 (4,0 – 5,0)
Гипероксия + N-АЦ водн.	230,6 (215,8 – 351,6)*	0,45 (0,40 – 0,50)	85,0 (82,0 – 86,0)*^	12,0 (10,0 – 14,0)*^	4,0 (2,0 – 5,0)
Гипероксия + N-АЦ липос.	456,0 (390,0 – 477,9)*^	0,75 (0,75 – 0,83)*^	80,0 (77,0 – 82,0)*	13,0 (12,0 – 16,0)*^	7,0 (5,0 – 8,0)*^

Примечание. Данные в таблицах 1 и 2 представлены в виде: медиана (25 процентиль – 75 процентиль);

\*  $p < 0,05$  по сравнению с группой «контроль»;

^  $p < 0,05$  по сравнению с группой «гипероксия»

При введении водного раствора N-ацетилцистеина в условиях гипероксии уровень белка имел тенденцию к снижению, но оставался достоверно повышенным в сравнении с контролем (на 40%), при этом достоверно уменьшалось количество нейтрофилов в БАЛЖ. Введение липосом, содержащих N-ацетилцистеин, приводило к выраженному росту концентрации белка и общего количества клеток в БАЛЖ (соответственно, на 178% и 100% по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ). Мы не можем однозначно судить о механизме развития такого эффекта в ответ на введение липосом с N-АЦ. Возможно, это вызвано особенностями воздействия липидного компонента липосом в условиях гипероксии, поскольку в группе «контроль + N-АЦ липос.» подобная выраженная реакция отсутствовала.

Продолжительное воздействие высоких концентраций кислорода сопровождалось достоверным увеличением содержания нейтрофильной эластазы в легких животных (на 196%,  $p < 0,05$ , табл. 2). Также отмечался рост активности А1-ПИ (на 78%,  $p < 0,05$ ), что, вероятно, является компенсаторной реакцией. Введение как водной, так и липосомной форм N-АЦ в опытных группах способствовало достоверному уменьшению содержания нейтрофильной эластазы и увеличению активности А1-ПИ в ткани легких новорожденных морских свинок, при этом эффект водного раствора препарата был более выраженным. Повышение активности А1-ПИ, по всей вероятности, обусловлено антиоксидантным эффектом N-АЦ и ослаблением окислительного повреждения молекул ингибитора. Из данных литературы известно, что окисление метионина в активном центре А1-ПИ (с образованием метионин сульфоксида) приводит к его полной инактивации [3], а ранее нами было показано, что окислительная модификация белков в легких усиливается в условиях гипероксии. Поскольку повреждающее действие эластазы в тканях сдерживается, главным образом, А1-ПИ [2], увеличение его активности после введения N-АЦ в условиях гипероксии можно рассматривать как положительный эффект.

Содержание коллагена в легких животных, подвергавшихся воздействию гипероксии на фоне ингаляционного введения N-АЦ, достоверно увеличивалось (табл. 2). Эти данные получили подтверждение после проведения морфологического исследования, которое показало, что в условиях введения обеих форм N-ацетилцистеина в легочной ткани экспериментальных животных соотношение суммарных площадей просвета альвеол и межальвеолярных перегородок нормализовалось и достоверно не отличалось от показателей контрольных групп (данные не представлены). Морфологические признаки воспаления в легочной ткани, характерные для пролонгированного действия гипероксии, были незначительными при первом способе коррекции (водный N-АЦ), и более выраженными

при втором способе (липосомный N-АЦ): отмечались отечность периваскулярных и перибронхиальных пространств, наличие воспалительных инфильтратов, представленных преимущественно мононуклеарными клеточными элементами, и небольших скоплений макрофагов и сегментоядерных лейкоцитов в просвете отдельных альвеол.

Таблица 2

Влияние N-ацетилцистеина на содержание коллагена, нейтрофильной эластазы и активность альфа1-протеиназного ингибитора в легких новорожденных морских свинок, подвергнутых воздействию гипероксии

Группа	Коллаген, мкг/г ткани/сутки	Нейтрофильная эластаза, пг/мг белка/г ткани	Активность А1-ПИ, МИЕ/мг белка/г ткани
Контроль	512,8 (443,2 – 563,5)	13,53 (10,21 – 19,19)	12,40 (6,38 – 28,33)
Контроль + N-АЦ водн.	574,5 (540,9 – 617,1)	7,20 (3,69 – 10,95)*	20,61 (12,74 – 32,22)
Контроль + N-АЦ липос.	643,8 (518,5 – 773,3)	5,04 (2,86 – 5,58)*	17,39 (12,68 – 21,93)
Гипероксия	364,9 (243,0 – 453,3)*	40,10 (21,99 – 63,43)*	22,14 (14,32 – 37,22)*
Гипероксия + N-АЦ водн.	675,5 (579,0 – 778,8)*^	16,00 (14,89 – 19,66)^	49,78 (43,06 – 54,39)*^
Гипероксия + N-АЦ липос.	611,5 (566,5 – 732,5)*^	22,84 (17,90 – 26,17)^	39,35 (36,65 – 42,19)*^

Таким образом, в условиях экспериментальной гипероксии ингаляционное введение водного раствора N-ацетилцистеина более эффективно (по сравнению с липосомной формой) предотвращает развитие патологических изменений в легких, способствует уменьшению воспаления, снижению интенсивности протеолитических процессов в легких за счет увеличения активности альфа1-протеиназного ингибитора и уменьшения уровня нейтрофильной эластазы. Возможность использования данного препарата для предотвращения повреждения легких новорожденных в условиях гипероксии и профилактики развития БЛД нуждается в дальнейшем изучении.

## EXPERIMENTAL USE OF WATER AND LIPOSOMAL FORMS OF N-ACETYLCYSTEINE FOR CORRECTION OF LUNG ALTERATIONS CAUSED BY HYPEROXIA

*Zh.A. Rutkovskaya*

Aerosolized N-acetylcysteine decreases the level of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid and the content of neutrophil elastase in lung tissue of newborn guinea pigs exposed to prolonged hyperoxia. The activity of alpha1-proteinase inhibitor increases, probably due to the antioxidant effect of N-acetylcysteine and suppression of protein oxidative modification. The aqueous form of N-acetylcysteine seems to be more effective in decreasing lung inflammation and proteolytic injury.

### Литература.

1. Котович, И.Л. Влияние экспериментальной гипероксии на активность нейтрофильной эластазы, матричных металлопротеиназ и альфа1-протеиназного ингибитора в легких / И.Л. Котович, Ж.А. Рутковская, Л.В. Редько и др. // Весті НАНБ, сер. мед. наук, 2012, №4. С. 63-68.
2. Lee, W.L. Leucocyte elastase. Physiological function and role in acute lung injury / W.L. Lee, G.P. Downey // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2001. – Vol.164. – P. 896-904.
3. Swaim, M.W. Methionine sulfoxide and the oxidative regulation of plasma proteinase inhibitors / M.W. Swaim, S.V. Pizzo // J. Leukocyte Biol. – 1988. – Vol.43. – P. 365-379.