

А. С. Кузьменок

**ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА СОДЕРЖАНИЕ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ В ЛЕГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ГИПЕРОКСИИ**

Научный руководитель канд. мед. наук, доц. И. Л. Котович

Кафедра биологической химии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A. S. Kuzmenok

**THE EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE ON THE CONTENT OF
INFLAMMATORY PROTEASES IN THE LUNGS DURING EXPERIMENTAL
HYPEROXIA**

Tutor Assistant professor, docent I. L. Kotovich

Department of Biological chemistry,

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Изучено влияние известного антиоксиданта и противовоспалительного препарата N-ацетилцистеина при ингаляционном введении на протеазно-антипротеазное соотношение и состояние межклеточного матрикса в легких при гипероксии (модель бронхолегочной дисплазии новорожденных).

Ключевые слова: бронхолегочная дисплазия, N-ацетилцистеин, эластаза нейтрофилов, матриксные металлопротеиназы, $\alpha 1$ -антитрипсин.

Resume. The effects of inhalation administration of N-acetylcysteine, a well-known antioxidant and anti-inflammatory drug, on the proteinase-antiproteinase ratio and the state of the intercellular matrix in the lungs during hyperoxia (model of bronchopulmonary dysplasia of the newborn), was studied.

Keywords: bronchopulmonary dysplasia, N-acetylcysteine, neutrophil elastase, matrix metalloproteinases, $\alpha 1$ -antitrypsin.

Актуальность. Одним из самых распространенных осложнений преждевременных родов и развивающегося на их фоне острого респираторного дистресс-синдрома новорожденных (ОРДСН) является возникающая в результате ИВЛ-терапии ОРДСН бронхолегочная дисплазия (БЛД). В основе развития БЛД лежит окислительный стресс и ассоциированное с ним хроническое воспаление. На биохимическом уровне повреждение ткани легких выражается в повышении уровня активных радикалов и опосредованном ими повреждении клеток, альтерации и экссудации жидкости через аэрогематический барьер (АГБ), нейтрофильной экссудации, повышении уровня воспалительных цитокинов. Среди факторов, разрушающих межклеточный матрикс и базальные мембраны, что приводит к ремоделированию межальвеолярных перегородок, эмфиземе, повреждению АГБ и развитию отека легких, важную роль играют воспалительные протеиназы (матриксные металлопротеиназы и эластаза нейтрофилов). В физиологических условиях активность протеиназ сдерживается системой ингибиторов – антипротеиназ [3]. Основным ингибитором эластазы является $\alpha 1$ -антитрипсин; матриксные металлопротеиназы блокируются $\alpha 2$ -макроглобулином или тканевыми ингибиторами (ТИМП).

Нейтрофильная эластаза – протеаза из семейства сериновых протеаз. Она локализуется в азурофильных гранулах нейтрофилов и в макрофагах, во внеклеточных

нейтрофильных ловушках. Она выступает в качестве воспалительной протеазы, разрушает эластин и коллаген IV типа, вызывая деградацию базальных мембран. Выброс нейтрофильной эластазы повышается при образовании активных форм кислорода (АФК). АФК могут также инактивировать альфа1-антитрипсин, тем самым снижая ингибирование эластазы.

α 1-антитрипсин – ингибитор протеаз суперсемейства серпинов, образующийся в печени, лейкоцитах, лимфоидной ткани и клетках Панета. Как и все серпины, α 1-антитрипсин содержит 2 основных функционально значимых домена – это А-лист и реактивная центральная петля. АФК могут окислять метионин в реактивной петле с образованием метионин-сульфоксида, что инактивирует ингибитор. Окисленные формы АТ способны даже усиливать воспаление, т.к. проявляют себя как хемоаттрактанты для нейтрофилов и активаторы моноцитов.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) относят к семейству цинк-зависимых протеаз. Источником их являются клетки фибробластического ряда, нейтрофилы, альвеолярные макрофаги. ММП-2 и 9, как и эластазу нейтрофилов, относят к воспалительным протеиназам. Их синтез регулируется как на уровне транскрипции (с помощью фактора транскрипции NF- κ B, который активируется свободными радикалами кислорода и азота, ФНО, ИЛ- β и другими воспалительными цитокинами), так и на уровне проферментов (активация путём частичного протеолиза). Субстратами являются коллаген IV, V, VII, X типов, желатин, фибронектин, эластин и др. Матриксные металлопротеиназы ингибируются тканевыми ингибиторами TIMP, α 2-макроглобулином.

Из всего вышесказанного следует, что воспалительные протеиназы имеют непосредственное отношение к повреждению легких при развитии БЛД; их продукция напрямую связана с окислительным стрессом в легких. Предполагается, что препараты антиоксидантного действия могут не только подавлять окислительный стресс, но и способствовать нормализации протеазно-антипротеазного дисбаланса в легких. В качестве препарата с известным антиоксидантным действием был выбран N-ацетилцистеин, который широко применяется при лечении различной патологии легких (но не при БЛД).

N-ацетилцистеин – известный муколитик и антиоксидант. За счёт тио- и карбоксильной групп он может связывать ионы цинка и подавлять синтез Zn-зависимых ММП; хелатировать ионы меди и железа и подавлять генерацию АФК в присутствии ионов переменной валентности. Наличие тиогруппы позволяет непосредственно восстанавливать окислители и поврежденные белки, разрушая образовавшиеся в ходе воспаления дисульфидные мостики (муколитическая активность). N-ацетилцистеин является также субстратом для синтеза глутатиона – известного антиоксидантного трипептида.

Большое значение имеет способ и форма введения лекарственного препарата. В данном исследовании мы выбрали ингаляционный способ введения N-ацетилцистеина в виде раствора или в липосомах из-за его неинвазивности и минимальных потерь лекарства при доставке.

Цель: изучение влияния N-ацетилцистеина при ингаляционном введении на уровни матриксных металлопротеиназ 2 и 9, нейтрофильной эластазы и коллагена и

активность альфа1-антитрипсина в легких в условиях экспериментальной гипероксии.

Задачи:

1. Установить содержание матриксных металлопротеиназ, нейтрофильной эластазы и коллагена, активности $\alpha 1$ -антитрипсина в легких в нормальных условиях и при гипероксии.

2. Изучить влияние N-ацетилцистеина в форме раствора на уровень данных воспалительных протеаз, коллагена и активность $\alpha 1$ -антитрипсина в легких при гипероксии.

3. Исследовать влияние липосомной формы N-ацетилцистеина на уровень данных воспалительных протеаз, коллагена и активность $\alpha 1$ -антитрипсина в легких при гипероксии.

Материал и методы. В качестве объекта исследования были выбраны новорожденные морские свинки вивария БГМУ и разделены на 4 группы: контроль, гипероксия, гипероксия+N-ацетилцистеин (р-р), гипероксия+N-ацетилцистеин (липосомы). Продолжительность эксперимента составила 14 суток; в каждой группе было по 4-5 особей. Свинок всех групп, кроме контрольной, инкубировали плексигласовой камере в атмосфере с содержанием O_2 не менее 70%; свинки контрольной группы дышали обычным воздухом. N-ацетилцистеин вводили 3 и 4 группам с помощью небулайзера 1 раз в два дня в дозе 250 мг/кг. 3 группа получала препарат в форме 20% водного раствора для ингаляций, 4 – в форме многослойных липосом, сконструированных на основе дипальмитоилфосфатидилхолина и 20% р-ра для ингаляций. По окончании срока свинок наркотизировали и извлекали лёгкие; их подвергали гомогенизации, центрифугированию, полученный же супернатант использовали для определения искомым показателей. Для определения содержания эластазы и MMP-2 и 9 использовали твердофазный иммуноферментный анализ по алгоритму ELISA. Активность $\alpha 1$ -антитрипсина определялась спектрофотометрически (метод, основанный на торможении аргинин-эстеразной активности трипсина). Коллаген определялся методом полуколичественной экстракции с уксусной кислотой. Показатели уровней эластазы и MMP-2 и 9 выражались в пг на мг белка, коллагена - в мкг на г ткани; активность $\alpha 1$ -антитрипсина выражалась в ингибиторных единицах (мИЕ на мг белка). Полученные данные подвергались статистической обработке в программе Statistica 10; достоверность различий определялась с помощью критерия Манна-Уитни (уровень значимости $p < 0,05$); они представлены в виде медианы и межквартильных размахов.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования приводятся на рисунках 1 и 2.

Изменения группы "гипероксия " по сравнению с группой контроль были следующие: уровень MMP-2 достоверно возрастал в 1,3 раза, уровень MMP-9 - почти в 1,8 раз (рис.1). Активность $\alpha 1$ -антитрипсина повышалась в 1,44 раза (рис.2), однако повышение уровня эластазы было большим - в 2,86 раз. Содержание коллагена падало в 1,4 раза (рис.2).

В группе 3 не выявлено значимых различий в уровне металлопротеаз по сравнению с группой гипероксия; однако уровень эластазы упал по сравнению с группой "гипероксия" (почти в 2,4 раза, практически до уровня контроля, рис.1). В этой

группе активность α 1-антитрипсина в легких была резко повышена (в 3,78 по сравнению с контролем, рис.2). Результирующее отношение активности α 1-антитрипсина к уровню эластазы (3,4), было значительно больше наблюдаемого в группе “гипероксия” (т.е. имел место сдвиг протеазно-антипротеазного равновесия в сторону подавления протеолиза). Возможно, этим обусловлено увеличение содержания коллагена в легких животных этой группы выше контрольного (в 1,5 раза, рис.2).

В группе 4 наблюдается нормализация показателей по уровням металлопротеаз и коллагена в сравнении с контролем; уровень α 1-антитрипсина хотя и ниже по сравнению с группой 3, но все ещё достоверно превышает контрольные значения (в 1,9 раз – рис. 2). Отношение активности α 1-антитрипсина к уровню эластазы (1,66) в большей степени приближается к контрольному (1), чем в группе 3 (3,4).

Полученные результаты показали, что эффекты от ингаляционного введения N-ацетилцистеина в виде водного раствора и в составе липосом на фоне гипероксии имеют некоторые различия. Так, N-ацетилцистеин в форме раствора не оказывал нормализующего влияния на уровень матричных металлопротеаз, но вызывал резкое повышение активности α 1-антитрипсина; при этом соотношение образования/деградации коллагена смещалось в сторону его образования.

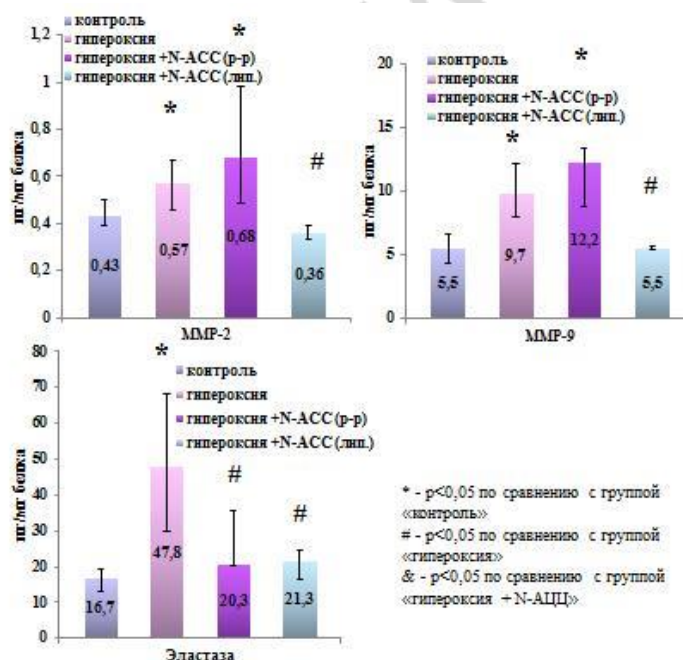


Рис. 1 – Изменения уровней матричных протеаз 2 и 9 и эластазы в изучаемых группах

Значительное увеличение уровня коллагена в легких, выявленное в группе 3, может быть обусловлено не только избыточным подавлением активности эластазы нейтрофилов. К этому эффекту может быть причастно также усиление синтеза проколлагена фибробластами в условиях гиперпродукции антитрипсина [1]. Тот факт, что повышение уровня коллагена в этой группе сочетается в повышенным уровнем MMP-2 и 9, представляется парадоксальным. Возможно, их влияние на компоненты межклеточного матрикса (в частности, коллаген), выражено в меньшей степени, чем у эластазы, за счет более низкой их концентрации в ткани легких (см. данные).

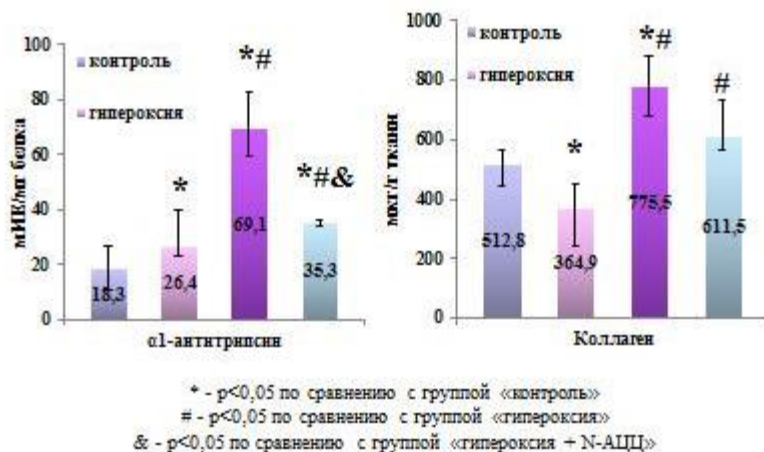


Рис. 2 – Изменения активности $\alpha 1$ -антитрипсина и уровня коллагена в изучаемых группах

Кроме того, нельзя исключить повышения экспрессии ТИМП в условиях гипероксии (такой эффект был описан ранее другими исследователями – [2]).

N-ацетилцистеин в липосомной форме приводил к нормализации всех исследуемых показателей, за исключением активности $\alpha 1$ -антитрипсина; она хотя и снижалась, все еще была достоверно выше по сравнению с контролем. После применения ингаляций с липосомной формой N-ацетилцистеина уровень ММП достоверно не отличался от контрольных значений, тогда как применение водного раствора не оказывало влияния на эти показатели. Можно предположить, что липосомная форма улучшает целевую доставку препарата и обеспечивает более пролонгированное его действие в отношении подавления окислительного стресса, что, в итоге, приводит к уменьшению продукции ММП (синтез этих ферментов зависит от редокс-статуса).

Выводы:

1 Введение N-ацетилцистеина в липосомной форме приводит к нормализации уровня воспалительных протеаз и коллагена, а, следовательно, и восстановлению нормального состояния межклеточного матрикса.

2 Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения эффектов N-ацетилцистеина в качестве потенциального средства патогенетической терапии БЛД.

Литература

1. Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways / Dabbash K, Laurent GJ, Shock A et al. // Journal of Cellular Physiology. – 2001. – №1. – P. 73-81.
2. Hosford GE. Hyperoxia decreases matrix metalloproteinase-9 and increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 protein in the newborn rat lung: association with arrested alveolarization / Hosford GE // Pediatric Research. – 2004. – № 56. – P. 26-34.
3. Gadek JE. The protease-antiprotease balance within the human lung: Implications for the pathogenesis of emphysema / Gadek JE // Lung. – 1990. – № 168. – P. 552–564.