

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ
АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛ И РЕТИНОИДЫ, НА УРОВЕНЬ
ФОСФОЛИПИДОВ СУРФАКТАНТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ГИПЕРОКСИИ**

Котович И.Л.,

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

Рутковская Ж.А.,

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

Таганович А.Д.,

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

Минск, Беларусь

В условиях эксперимента впервые показано, что ингаляционное введение липосом, содержащих α -токоферол, эффективно нормализует уровень сурфактантных фосфолипидов на фоне относительно непродолжительной гипероксии (3 суток). Ингаляционное введение липосом, содержащих ретинол и ретиноевую кислоту, в условиях гипероксии способствует выраженному увеличению уровня фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости.

Ключевые слова: Легкие; гипероксия; фосфолипиды; липосомы; α -токоферол; ретиноиды

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECT OF LIPOSOMES
CONTAINING ALPHA-TOCOPHEROL AND RETINOIDS ON THE LEVEL
OF SURFACTANT PHOSPHOLIPIDS IN EXPERIMENTAL 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*

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Under experimental conditions, it was shown for the first time that inhalation of liposomes containing α -tocopherol effectively normalizes the level of surfactant phospholipids under the relatively short-term hyperoxia (3 days). Inhalation of liposomes containing retinol and retinoic acid in hyperoxia promotes a pronounced increase in the level of phospholipids in the bronchoalveolar fluid.

Key words: Lungs; hyperoxia; phospholipids; liposomes; α -tocoferol; retinoids

Зрелость системы легочного сурфактанта играет важную роль в предотвращении развития респираторного дистресса у новорожденных и бронхолегочной дисплазии. Недостаточность сурфактанта у недоношенных новорожденных является одним из факторов, способствующих развитию патологии легких, а выхаживание таких новорожденных с использованием высоких концентраций кислорода во вдыхаемой смеси провоцирует усиление продукции активных форм кислорода, что на фоне дефицита антиоксидантов является дополнительным фактором, способствующим окислительному повреждению клеточных и молекулярных структур в альвеолярном пространстве [1]. В связи с этим актуальным является изучение возможности усиления синтеза и секреции эндогенного сурфактанта, а также защиты его компонентов от окислительного повреждения в легких в условиях гипероксии.

Природные антиоксиданты, в частности витамины Е (α -токоферол) и А (ретинол), являются важными компонентами локальной системы антиоксидантной защиты в легких, включаются альвеолоцитами II типа в состав легочного сурфактанта и защищают его ненасыщенные липидные фракции от повреждения оксидантами [2]. Витамин А, помимо антиоксидантных свойств, имеет важное значение для процессов созревания легких, формирования альвеол, синтеза и секреции компонентов сурфактанта [3]. Возможность коррекции фосфолипидного состава сурфактанта путем ингаляционного введения этих антиоксидантов у новорожденных ранее не изучалась. По нашему мнению, ингаляционный путь является предпочтительным при необходимости доставки препаратов непосредственно в легкие, а его неинвазивность повышает возможности его применения у новорожденных. Учитывая липофильную природу ретинола и α -токоферола, а также невозможность использования органических растворителей для их солюбилизации для применения *in vivo*, мы сочли наиболее рациональным подходом приготовление липосомных форм данных препаратов для их введения ингаляционным путем.

Цель исследования – изучить влияние липосом, содержащих α -токоферол и ретиноиды, при ингаляционном введении на фосфолипидный состав сурфактанта в условиях экспериментальной гипероксии.

Материалы и методы. Эксперимент проводили с соблюдением этических норм и правил работы с лабораторными животными. При проведении исследования использовались новорожденные морские свинки вивария БГМУ. Животные контрольных групп дышали обычным воздухом, животных из групп «гипероксия» в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70% (температура 20-25°C, относительная влажность 50-80%). Длительность наблюдения составляла 3 и 14 суток. Контрольные животные дышали обычным воздухом. Каждая экспериментальная группа включала 8-10 животных.

Для ингаляционного введения липосом использовали компрессорный небулайзер Comp Air (NE-C28-E, Omron, Китай). Ингаляции проводили 1 раз в два дня. Липосомы готовили стандартным методом механического диспергирования, в качестве основного липидного компонента использовали дипальмитоилфосфатадилхолин (ДПФХ). В группе «гипероксия + α -токоферол» для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь многослойных 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. Группа «гипероксия + ретиноиды» получала ингаляции свежеприготовленных многослойных липосом, содержащих ретинол (6 мг/кг), ретиноевую кислоту (0,6 мг/кг), дипальмитоилфосфатадилхолин (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4. Для анализа влияния основного компонента липосом (ДПФХ) на изучаемые показатели были сформированы отдельные группы животных (n=4 в каждом сроке наблюдения), которые получали ингаляции «пустых» липосом, не содержащих витамины.

По окончании эксперимента животных наркотизировали и получали бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ) для исследования. В бесклеточном супернатанте БАЛЖ определяли общий белок (по Лоури) и основные фракции сурфактантных фосфолипидов – фосфатадилхолин (ФХ) и его преобладающую форму в сурфактанте – динасыщенный фосфатадилхолин (ДНФХ); суммарную фракцию фосфатадилэтаноламина (ФЭА), включающую также фосфатадилглицерол, фосфатадилинозитол и фосфатадилсерин; сфингомиелин (СМ); лизофосфатадилхолин (лизоФХ). Липиды разделяли методом двумерной тонкослойной хроматографии и проводили количественный учет фракций по содержанию липидного фосфора.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 10,0. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический тест Манна-Уитни для независимых выборок. Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (25% - 75%).

Результаты и обсуждение. Введение липосом, содержащих α -токоферол, на фоне непродолжительной гипероксии (3 суток) сопровождалось нормализацией уровня всех фракций фосфолипидов в БАЛЖ, о чем свидетельствует отсутствие достоверных отличий показателей с соответствующей группой «контроль» (таблица 1). Введение липосом, содержащих α -токоферол, на фоне длительной гипероксии (14 суток) характеризовалось сохранением низкого уровня СМ, суммарного ФХ, ДНФХ и общего липидного фосфора в БАЛЖ новорожденных морских свинок.

Введение липосом, содержащих ретиноиды, на фоне непродолжительной гипероксии (3 суток) сопровождалось увеличением уровня фосфолипидов в БАЛЖ, которое было еще более выраженным, чем у животных, подвергавшихся изолированному действию гипероксии: в этой группе уровень суммарного

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

фосфатидилхолина превышал уровень контроля на 235% (в группе «гипероксия» увеличение составляло 98%), дианасыщенного фосфатидилхолина – на 307% (в группе «гипероксия» – 115%), различия с группой «гипероксия» статистически достоверны; отмечался также рост уровня фосфатидилэтаноламина на 76% ($p < 0,05$ по сравнению с контролем). Введение липосом, содержащих ретиноиды, на фоне длительной гипероксии (14 суток) препятствовало снижению уровня фосфолипидов в БАЛЖ, которое наблюдалось при действии изолированной гипероксии. В целом показатели всех фракций фосфолипидов в этой группе приближались к значениям в группе контроля и достоверно от них не отличались.

При введении «пустых» липосом на фоне гипероксии достоверных изменений уровней фосфолипидов в БАЛЖ по сравнению с соответствующими группами «гипероксия» выявлено не было.

Таблица 1. – Содержание фосфолипидов в БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергавшихся гипероксии, при ингаляционном введении липосом с ретиноидами и α -токоферолом

Показатель	Контроль	Гипероксия	Гипероксия + ретиноиды	Гипероксия + α -токоферол
Срок наблюдения 3 суток				
ЛизоФХ	18,5 (4,1 – 29,6)	0 (0 – 39,7)	53,8 (15,3 – 82,9)	52,1 (16,8 – 68,9)
СМ	11,3 (1,0 – 39,7)	11,0 (0 – 17,5)	27,3 (1,0 – 52,9)	30,7 (12,7 – 33,9)
ФЭА	97,9 (60,6 – 142,5)	97,2 (57,8 – 181,8)	172,2 (150,2 – 228,6)*	129,9 (110,7 – 140,9)
ДНФХ	220,2 (121,7–301,1)	473,6 (352,4 – 513,1)*	897,2 (726,7 – 960,5)*^#	345,2 (266,2 – 482,1)
ФХ сумм.	406,3 (293,5 – 514,7)	805,0 (598,2 – 978,4)*	1362,9 (881,5 – 1547,7)*^#	557,4 (466,4 – 632,3)
ОЛФ	538,1 (388,2 – 780,3)	981,4 (898,2 – 1235,2)*	1576,1 (1142,9 – 1817,3)*#	757,9 (721,2 – 831,6)
Срок наблюдения 14 суток				
ЛизоФХ	55,4 (19,4 – 70,7)	0 (0 – 20,1)*	43,4 (25,3 – 74,7)^	36,8 (30,5 – 43,1)^
СМ	74,5 (0 – 123,9)	0 (0 – 12,8)*	56,1 (48,6 – 72,0)^#	4,8 (0 – 6,0)*
ФЭА	190,5 (84,1 – 458,8)	37,5 (0 – 100,5)*	176,1 (163,2 – 183,8)^#	79,0 (65,6 – 92,4)

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

ДНФХ	811,1 (703,6 – 920,4)	295,1 (209,3 – 326,1)*	683,1 (610,4 – 736,2)^#	306,6 (256,1 – 422,4)*
ФХ сумм.	1300,4 (921,6 – 1645,6)	405,2 (311,2 – 749,2)*	977,5 (947,4 – 1087,3)^ #	437,2 (387,5 – 486,8)*
ОЛФ	1841,6 (932,5 – 2293,6)	539,3 (443,4 – 1016,2)*	1270,3 (1214,6 – 1370,6)^#	553,0 (483,6 – 622,4)*

Примечание – Содержание фосфолипидов представлено в нмоль фосфора/мг белка. ЛизоФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, ДНФХ – динасыщенный фосфатидилхолин, ФХ сумм. – суммарная фракция фосфатидилхолина, ОЛФ – общий липидный фосфор. * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «контроль»; ^ - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «гипероксия»; # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «гипероксия + токоферол».

Обнаруженные эффекты согласуются с данными литературы о наличии у α -токоферола противовоспалительных эффектов, проявляющихся *in vitro* и *in vivo* при относительно непродолжительном действии повреждающего агента [4, 5], однако при более пролонгированном действии гипероксии липосомы с токоферолом оказались неэффективными в плане предотвращения резкого снижения уровня сурфактантных фосфолипидов в БАЛЖ. Можно предположить, что для нормализации состава сурфактанта при гипероксии требуется наличие у препаратов не только антиоксидантных свойств. Эффект «заместительной терапии» при введении липосом, содержащих ДПФХ, также не был выявлен, что подтверждается отсутствием достоверных изменений показателей при введении «пустых» липосом на фоне гипероксии. В нашем исследовании впервые было показано, что ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом *in vivo* способствует достоверному увеличению уровня сурфактантных фосфолипидов в легких как при кратковременном, так и при продолжительном действии гипероксии, в отличие от α -токоферола, что может быть обусловлено стимулирующим действием ретиноевой кислоты на синтез сурфактанта и пролиферацию клеток альвеолярного эпителия [3].

Таким образом, в условиях трехдневной гипероксии ингаляционное введение липосом, содержащих α -токоферол, способствует нормализации уровня сурфактантных фосфолипидов в эксперименте, но не оказывает такого влияния при более продолжительном действии гипероксии (14 суток). Ингаляционное введение липосом с ретиноидами в условиях 3- и 14-суточной гипероксии сопровождается выраженным увеличением уровня фосфолипидов в легких новорожденных морских свинок.

Список литературы

1. Cienczewicki J. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases / J. Cienczewicki, S. Trivedi, S. R. Kleeberger // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2008. – Vol. 122, N. 3. – P. 456–470.
2. Kolleck I. Vitamin E as an antioxidant of the lung. Mechanisms of vitamin E delivery to alveolar type II cells / I. Kolleck, P. Sinha, B. Rustow // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2002. – Vol. 166. – P. S62 – S66.
3. George, U.M. Effect of tobacco extract on surfactant synthesis and its reversal by retinoic acid – role of cell–cell interactions in vitro / U.M. George, U. Ashna, S.S. Pradeep Kumar, A.M. Nandkumar // *In vitro Cell.Dev.Biol.- Animal*. – 2013. – Vol. 49. – P. 260-269
4. Ekstrand-Hammarstrom B. Vitamin E down-modulates mitogen-activated protein kinases, nuclear factor- κ B and inflammatory responses in lung epithelial cells / B. Ekstrand-Hammarstrom, C. Osterlund, B. Lillienhook, A. Bucht // *Clin. Experim. Immunol*. – 2006. – Vol. 147. – P. 359-369.
5. Hyberston B.M. Aerosol-administered α -tocopherol attenuates lung inflammation in rats given lipopolysaccharide intratracheally / B.M. Hyberston, J.H. Chung, M.A. Fini, Y.M. Lee, J.D. Allard [et al.] // *Exp. Lung Res*. – 2005. – Vol. 31, N. 3. – P. 283-294.