

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРОКСИИ

Рутковская Ж.А.

кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры биологической химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь RutkovskayaZh@yandex.ru;

Котович И.Л.

кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры фармакологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь kotovich-iryna@rambler.ru;

Саттаров Р.М.

студент 3 курса лечебного факультета учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь lomonosovolym28@gmail.com

Матюхевич А.С.

студент 3 курса лечебного факультета учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь nastya.matyukhevich99@gmail.com

Таганович А.Д.

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь ТагановичAD@bsmi.by;

Аннотация. Ингаляционное введение N-ацетилцистеина уменьшает повреждающее действие высоких концентраций кислорода на легкие новорожденных морских свинок, что подтверждается уменьшением содержания продуктов окислительной модификации липидов и белков, нормализацией фосфолипидного состава сурфактанта, снижением активности протеолитических ферментов в легких.

Ключевые слова: гипероксия; легкие; n-ацетилцистеин; фосфолипиды; прооксидантно-оксидантный статус; протеазы; антипротеазы

USE OF N-ACETYLCYSTEINE TO PREVENT CHANGES IN THE LUNGS UNDER HYPEROXY

Rutkovskaya Zh.A.

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State Medical University",
Minsk, Belarus,
RutkovskayaZh@yandex.ru;
Kotovich I.L.*

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology of the Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Belarus
Kotovich-iryana@rambler.ru;
Sattarov R.M.*

*3rd year student of the Faculty of General Medicine of the Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Belarus
lomonosovolymp28@gmail.com
Matyukhevich A.S.*

*3rd year student of the Faculty of General Medicine of the Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Belarus
nastya.matyukhevich99@gmail.com
Taganovich A.D.*

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Belarus
TahanovichAD@bsmu.by;*

Annotation. *Inhalation administration of N-acetylcysteine reduces the damaging effect of high oxygen concentrations on the lungs of newborn guinea pigs, which is confirmed by a decrease in the content of products of oxidative modification of lipids and proteins, normalization of the phospholipid composition of the surfactant, and a decrease in the activity of proteolytic enzymes in the lungs.*

Keywords: *hyperoxia, lungs, n-acetylcysteine, phospholipids, prooxidant-oxidant status, proteases, antiproteases.*

Снижение младенческой смертности является одним из приоритетных направлений неонатальной пульмонологии. С этой целью при выхаживании новорожденных с проводится оксигенотерапия. Высокие концентрации кислорода, используемые при проведении оксигенотерапии, оказывают выраженное повреждающее действие на функционально незрелую легочную ткань недоношенных младенцев, что в последствии приводит к развитию тяжелой патологии легких – бронхолегочной дисплазии (БЛД) [1]. Изменения, вызываемые воздействием высоких концентраций кислорода, связывают со стимуляцией продукции свободных радикалов кислорода и повреждение клеток

и молекулярных структур легких продуктами окисления [2]. Учитывая выявленные патогенетические механизмы развития БЛД оправдано использование препаратов с антиоксидантным эффектом для коррекции прооксидантно-антиоксидантного статуса и предупреждения деструктивных процессов в легочной ткани.

Целью исследования было изучить эффективность водной и липосомальной форм N-ацетилцистеина для коррекции прооксидантно-антиоксидантного статуса, снижения активности протеаз и восстановления фосфолипидного состава сурфактанта легких.

В эксперименте использовали новорожденных морских свинок, находившихся на стандартном рационе вивария БГМУ с соблюдением этических норм и правил проведения работ с лабораторными животными. В течение суток после рождения животных опытной группы 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%). Концентрацию кислорода в камере контролировали с помощью анализатора кислорода ПГК-06-100Р (ЗАО «Инсовт», РФ). Длительность воздействия гипероксии составляла 3 и 14 суток. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. В каждой экспериментальной группе находилось 4-5 животных. Приводимые данные – результат двух независимых экспериментов для каждого из изучаемых сроков воздействия.

Коррекцию проводили с помощью ингаляционного введения водной и липосомальной форм N-ацетилцистеина. Для приготовления водного раствора использовали 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), рН=7,4), а для изготовления липосом использовали 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), рН=7,4. Ингаляции животным проводили 1 раз в два дня, всего дважды в течение 3 суток и 7 раз в течение 14 суток воздействия гипероксии с использованием компрессорного небулайзера (Omron, Китай).

По окончании эксперимента животных наркотизировали тиопенталом натрия (15 мг/кг интраперитонеально) и получали материал для исследования: бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ), гомогенат легких и плазму крови, где определяли следующие показатели: интенсивность генерации активных форм кислорода (АФК) клетками БАЛЖ, активность основных антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза (ГП)),

содержание восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений, содержание карбонильных производных аминокислот в белках, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), диеновых конъюгатов, оснований Шиффа, концентрацию нитрит-ионов, содержание общего белка, основных фосфолипидных фракций сурфактанта легких в БАЛЖ, содержание нейтрофильной эластазы и активность альфа1-протеиназного ингибитора (А1-ПИ) в гомогенатах легких и плазме крови.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0, статистический анализ проводили с использованием непараметрического U-теста Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (25 перцентиль – 75 перцентиль), охватывающих 50% наблюдений.

Результаты. Гипероксия приводит к увеличению интенсивности образования активных форм кислорода клетками БАЛЖ. В эксперименте установлено, что интегральная интенсивность хемилюминесценции клеток новорожденных морских свинок увеличилась на 151% ($p < 0,05$) уже при кратковременном воздействии гипероксии (в течение 3 суток) в условиях гипероксии. При увеличении продолжительности воздействия гипероксии до 14 суток интенсивность продукции АФК клетками БАЛЖ уменьшалось по сравнению с группой животных «3 суток», но было выше по сравнению с интактными животными на 56% ($p < 0,05$). Также в ответ на стимуляторы (липополисахарид и латекс) в группе «14 суток гипероксии» интенсивность генерации АФК клетками снизилась на 28,8% и 18,0% соответственно ($p < 0,05$). Ингаляции как с водной, так и с липосомальной формой N-ацетилцистеина предотвращали образование АФК в опытных группах, что подтверждается нормализацией интегральной интенсивности хемилюминесценции ЛЗХЛ в группах «3 суток» и «14 суток» воздействия гипероксии и сохранением тенденции к снижению интенсивности ответа латекс и липополисахарид.

Длительное воздействие гипероксии в течение 14 суток привело к снижению глутатиона и других небелковых SH-соединений в БАЛЖ в 1,5 раза ($p < 0,05$). Эти изменения могут быть результатом снижения активности глутатионзависимых ферментов, что подтверждается резким, в 3,3 раза ($p < 0,05$), снижением активности ГП при длительном воздействии гипероксии. Введение N-ацетилцистеина (как водной, так и липосомальной формы) нормализовало систему глутатион-глутатионзависимые ферменты: содержание восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений и активность глутатионпероксидазы в БАЛЖ увеличились и достоверно не отличались от

контроля. Разная продолжительность воздействия гипероксии не оказала влияния на активность СОД и каталазы в БАЛЖ животных.

Длительное воздействие гипероксии на фоне снижения работы антиоксидантной системы привело к росту продуктов липопероксидации и карбонильных производных аминокислот в БАЛЖ. Содержание диеновых конъюгатов, продуктов, реагирующих с ТБК, и оснований Шиффа достоверно увеличилось в среднем в 2 раза по сравнению с контрольной группой. В 2,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем возросло количество продуктов окислительной модификации белков в БАЛЖ. Ингаляционное введение раствора и липосом с N-ацетилцистеином сопровождалось снижением уровня продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в БАЛЖ и ткани легкого до контрольных значений.

Длительная гипероксия привела к резкому снижению содержания сурфактантных липидов в БАЛЖ. Содержание ФЭА (фосфатидилэтаноламин) и ДНФХ (динасыщенный фосфатидилхолин) уменьшилось 5,1 и 3,5 раза соответственно ($p < 0,05$) по отношению к контролю, а ЛизоФХ (лизофосфатидилхолин) и СМ (сфингомиелин) в БАЛЖ животных после длительного воздействия высоких концентраций кислорода отсутствовали. После введения N-ацетилцистеина на фоне гипероксии содержание СМ, ДНФХ и ФЭА нормализовалось (полученные данные достоверно не отличались от контроля), а содержание ЛизоФХ в БАЛЖ возросло, хотя и не достигло контрольных значений. Полученные положительные изменения сурфактантного состава фосфолипидов могут быть результатом не только антиоксидантного действия N-ацетилцистеина, но и увеличением секреторной активности альвеолоцитов II типа, которые продуцируют сурфактант (данный эффект N-ацетилцистеина описан в литературе).

Воздействие высоких концентраций кислорода также привело к увеличению на 91% ($p < 0,05$) уровня белка в БАЛЖ (в сравнении с контролем). Как известно, увеличение уровня белка в альвеолярном пространстве наблюдается при воспалении и при отеке легких и является следствием трансудации белков плазмы крови (альбуминов)[3]. Длительная гипероксия (14 суток) способствует развитию воспалительной реакции в легких новорожденных животных, что подтверждается выявленным нами значительным возрастанием в 11 раз по сравнению с контролем ($p < 0,05$) нейтрофилов в БАЛЖ. Введение водного раствора N-ацетилцистеина не нормализовало уровень нейтрофилов в БАЛЖ, а содержание белка, хотя и имело тенденцию к снижению, оставалось повышенным 40% по отношению к контролю. Ингаляции липосом с N-ацетилцистеином приводили к росту концентрации белка в БАЛЖ (содержание белка увеличилось в 1,8 раза по сравнению с контролем, $p < 0,05$).

В опытных группах «14 суток» выявлено значительное, в 13,5 раза ($p < 0,05$) увеличение содержания нейтрофильной эластазы, не смотря на рост активности альфа1-протеиназного ингибитора. Введение как водного раствора, так и липосомальной формы N-ацетилцистеина способствовало уменьшению содержания нейтрофильной эластазы до уровня контрольных значений на фоне резкого роста активности А1-ПИ в легких экспериментальных животных.

Таким образом, как водорастворимая, так и в липосомальная формы N-ацетилцистеина при ингаляционном введении тормозят развитие патологических изменений в легочной ткани, индуцированных длительной гипероксией путем снижения интенсивности образования активных форм кислорода, уменьшения содержания продуктов окислительной модификации липидов и белков, увеличения активности глутатионпероксидазы и уровня небелковых SH-соединений, нормализации фосфолипидного состава сурфактанта, снижения уровня нейтрофильной эластазы и увеличения активности альфа1-протеиназного ингибитора в легких новорожденных морских свинок. Полученные данные позволяют утверждать, что ингаляционное введение N-ацетилцистеина может быть эффективно для профилактики развития явлений бронхолегочной дисплазии.

Список литературы

1. Прометной Д.В, Александрович Ю.С., Вороненко И.И. Факторы риска, предикторы и современная диагностика бронхолегочной дисплазии/ Педиатр. – 2017. – Т. 8. – № 3. – С. 142–150.
2. Лебедева О.В. Факторы риска формирования бронхолегочной дисплазии у новорожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении / Педиатрическая фармакология. – 2014. – Т. 11. – № 3. – С. 37–41.
3. Bhandari V. Postnatal inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol (2014) 100(3):189–201.