

А.В. Дубейко

**ВЛИЯНИЕ РЕТИНОИДОВ В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ НА СИСТЕМУ
ПРОТЕАЗЫ/АНТИПРОТЕАЗЫ В ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ
МОРСКИХ СВИНОК В ДИНАМИКЕ ГИПЕРОКСИИ**

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

Кафедра биологической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A.V. Dubeyko

**THE EFFECT OF RETINOIDS IN THE COMPOSITION OF LIPOSOMES
ON THE PROTEASE/ANTI-PROTEASE SYSTEM IN THE LUNGS
OF NEWBORN GUINEA PIGS IN THE DYNAMICS OF HYPEROXIA**

Tutor: M.D., Ph.D., Assoc. Prof. Zh.A. Rutkovskaya

Department of Biological chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В работе представлены данные исследования влияния ретиноидов в составе липосом на активность альфа-1-протеиназного ингибитора, содержание нейтрофильной эластазы и коллагена в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии.

Ключевые слова: протеаза, коллаген, гипероксия, ретиноиды, липосомы.

Resume. The research contains data on the influence of retinoids in liposomes on the activity of alpha-1-proteinase inhibitor, neutrophilic elastase and collagen content in the lung of the newborn guinea pigs under hyperoxia.

Keywords: protease, collagen, hyperoxia, retinoids, liposomes.

Актуальность. В последние десятилетия в развитых странах частота преждевременных родов достаточно стабильна и составляет 5-10 %. Способность ребенка выжить в этом случае напрямую зависит от степени развития его органов и возможности существования вне организма матери. Развитие перинатальной и неонатальной медицины, совершенствование методов интенсивной терапии и респираторной поддержки новорожденных позволило повысить выживаемость недоношенных детей с низкой массой тела. У таких детей выявляется морфологическая и функциональная незрелость жизненно важных систем, в числе которых система дыхания. Последнее обуславливает использование кислорода для становления функции дыхания. Широко используются различные виды оксигенотерапии, например, искусственная вентиляция легких (ИВЛ) [4]. Использование высоких концентраций кислорода на фоне респираторных нарушений являются ведущими патогенетическими факторами в развитии нарушений в обмене веществ и в последующем заболеваний. Вследствие этого на настоящий момент достаточно актуальна проблема формирования у данного контингента больных хронических заболеваний легких. В последние годы на первое место по частоте и клинической значимости выходит бронхолегочная дисплазия (БЛД) как наиболее распространенная форма патологических изменений легочной ткани в период новорожденности, нередко являющаяся причиной отдаленной летальности [1].

Среди вероятных причин развития БЛД называют механическое повреждение легких при ИВЛ (баротравма, волюмотравма), токсическое действие кислорода, незрелость легочной ткани и недостаточность антиоксидантных систем у недоношенных новорожденных, однако степень вклада указанных факторов в патогенез заболевания не установлена. Повреждение легких сопровождается развитием воспалительной реакции с последующей репарацией в виде пролиферации фибробластов. Это ведет к нарастанию фиброзных изменений в легочной ткани [1].

Коллаген – основной белок межклеточного матрикса, который составляет около 15% массы легкого. От содержания коллагена будет зависеть прочность и проницаемость альвеолокапиллярных мембран. Есть факторы, влияющие на распад коллагена до аминокислот [2]. В случае активного гидролиза коллагена до аминокислот, его содержание в легких уменьшается. Усиление распада соединительнотканых белков может быть вызвано воздействием активных форм кислорода (что и происходит при ИВЛ), а также влиянием протеаз. Одним из таких ферментов является фермент нейтрофильная эластаза (НЭ). Для контроля активности нейтрофильной эластазы существует специальный ингибитор – $\alpha 1$ -антитрипсин (или $\alpha 1$ -протеиназный ингибитор, А1-ПИ).

Витамин А играет важную роль в процессах развития и репарации легких. Помимо антиоксидантного действия, ретиноиды принимают участие в развитии иммунологического и воспалительного ответа за счет регуляции синтеза цитокинов и факторов роста на уровне транскрипции [3]. Одним из способов, повышающим эффективность препаратов, считается их включение в липосомы, что облегчает проникновение веществ в клетки и увеличивает продолжительность их действия. При заболеваниях легких липосомы могут быть эффективным средством доставки веществ к клеткам альвеолярного эпителия. Ингаляционное введение ретиноидов ранее не применялось.

Цель: изучить влияние ретиноидов, включенных в состав липосом на содержание нейтрофильной эластазы, коллагена и активность $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора в легких новорожденных морских свинок в динамике гипероксии.

Задачи:

1. Определить содержание $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора, нейтрофильной эластазы и коллагена в гомогенате легких новорожденных морских свинок в динамике гипероксии.

2. Оценить влияние ретиноидов в составе липосом на содержание $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора, нейтрофильной эластазы и коллагена в гомогенате легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии.

Материал и методы. В эксперименте было сформировано 4 группы новорожденных морских свинок: 1 – контроль, 2 – гипероксия, 3 – контроль + ретиноиды, 4 – гипероксия + ретиноиды. Животных опытных групп в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, где постоянно поддерживали концентрацию кислорода не менее 70%. Длительность воздействия гипероксии составляла 3 и 14 суток. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. Экспериментальной группе морских свинок ингаляционно с помощью компрессорного небулайзера Comp Air (NE-C28-E, Omron,

Китай) вводилась свежеприготовленная смесь мультиламеллярных липосом, содержащих ретинол (6 мг/кг), ретиноевую кислоту (0,6 мг/кг), дипальмитоилфосфатидилхолин (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), рН=7,4. По окончании эксперимента животных наркотизировали тиопенталом натрия интраперитонеально и получали материал для исследования не ранее чем через 22 часа после последнего введения препарата. В качестве материала для исследования использовали гомогенат легких.

Для получения тканевого гомогената легкие после удаления крупных бронхов взвешивали на аналитических весах, тщательно измельчали ножницами, после чего растирали в стеклянном гомогенизаторе во льду, добавляя физиологический раствор, до образования однородного гомогената. Определялись следующие показатели: содержание нейтрофильной эластазы, коллагена и активность α 1-протеиназного ингибитора.

Содержание нейтрофильной эластазы определялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Измерение оптической плотности проб и стандартов проводилось при 450 нм на иммуноферментном анализаторе. Содержание эластазы в гомогенате легких выражали в пг/мг белка/г ткани. Активность α 1-протеиназного ингибитора определялось спектрофотометрическим методом, предложенным Нартиковой и Пасхиной. Метод основан на торможении аргинин-эстеразной активности трипсина. Активность А1-ПИ выражали в ингибиторных единицах (мИЕ/мг белка/г ткани). Для определения содержания коллагена в гомогенатах легких использовали метод экстракции его кислотными растворителями после предварительного удаления примесей растворимых неколлагеновых белков. Экстракцию неколлагеновых белков проводили раствором NaH_2PO_4 (0,02 моль/л), экстракцию коллагена – уксусной кислотой (0,5 моль/л). Содержание коллагена в гомогенатах выражали в мкг/г ткани/24 часа.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8,0. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (25 перцентиль – 75 перцентиль).

Результаты и их обсуждение. При непродолжительном воздействии гипероксии (3 суток) у контрольных животных не происходит достоверного изменения изучаемых показателей. При увеличении сроков гипероксии до 14 суток увеличение активности А1-ПИ не оказывает должного сдерживающего эффекта, в результате чего возрастает содержание нейтрофильной эластазы в легких в 3 раза ($p < 0,05$). Повреждение в системе протеазы-антипротеазы отражает наличие повреждений в белковых структурах легких в условиях гипероксии: на 14-е сутки содержание коллагена в легких опытных животных уменьшилось в 1,4 раза ($p < 0,05$), в то время как у контрольных животных практически не изменилось.

Полученные результаты свидетельствуют, что усиление активности А1-ПИ оказалось эффективным только при непродолжительном воздействии гипероксии (3 суток). При увеличении сроков гипероксии до 14 суток увеличение активности А1-ПИ не оказало должного сдерживающего эффекта, в результате чего возросло содержание нейтрофильной эластазы в легких. Можно предполагать наличие

нескольких механизмов, сдерживающих увеличение активности А1-ПИ в легких при длительном воздействии высоких концентраций кислорода. Во-первых, данный ингибитор является чувствительным к окислительному повреждению, так как в его активном центре присутствует метионин, способный окисляться с образованием метионин сульфоксида, что приводит к инактивации фермента. Другой причиной, может быть протеолитическое расщепление молекул А1-ПИ за счет действия металло- и сериновых протеаз, которые продуцируются нейтрофилами и макрофагами легких в зоне воспаления (таблица 1).

Табл. 1. Содержание эластазы, коллагена и активность А1-ПИ в легких новорожденных морских свинок

Показатель	Группа		Без коррекции	+ Ретиноиды
А1-ПИ, мИЕ/мг белка/г ткани	3 суток	контроль	17,0 (6,4 – 28,3)	9,9 (8,8 – 10,7)
		гипероксия	30,9 (10,5 – 47,1)*	27,8 (19,5 – 38,2)
	14 суток	контроль	12,4 (6,3 – 28,3)	9,1 (8,5 – 11,7)
		гипероксия	22,1 (14,3 – 37,2)*	31,1 (17,5 – 35,3)*
Эластаза, пг/мг белка/г ткани	3 суток	контроль	10,4 (9,5 – 15,4)	12,4 (9,4 – 14,3)
		гипероксия	8,7 (5,7 – 17,2)	9,1 (8,2 – 13,5)
	14 суток	контроль	13,5 (10,2 – 19,2)	7,9 (6,3 – 9,4)*
		гипероксия	40,1 (22,0 – 63,4)*	8,4 (5,6 – 13,7)^
Коллаген, мкг/г ткани/24 часа	3 суток	контроль	501,6 (451,1 – 593,5)	597,1 (496,3 – 723,5)
		гипероксия	633,9 (564,9 – 809,4)*	544,7 (461,7 – 587,5)
	14 суток	контроль	512,8 (443,2 – 563,5)	558,6 (460,5 – 658,9)
		гипероксия	364,9 (242,9 – 453,3)*	878,3 (728,4 – 904,3)*^

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «контроль без коррекции», ^ - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «гипероксия без коррекции».

Введение ретиноидов не привело к достоверному увеличению активности А1-ПИ у животных 4 группы по сравнению с группой «гипероксия 14 суток», однако этот показатель был повышен более чем в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «контроль». Также у животных 4 группы уменьшилось содержание нейтрофильной эластазы в 4,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «гипероксия» и восстановилось соотношение протеазы/антипротеазы. Восстановление баланса в системе «протеазы/антипротеазы» должно предотвращать деструктивные повреждения легочной ткани. Подтверждением этому является выявленное нами увеличение

содержания коллагена в гомогенате более чем в 2,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «гипероксия 14 суток».

Противовоспалительное действие витамина А связывают с регуляцией продукции провоспалительных медиаторов и хемокинов. По нашим данным ретиноиды не оказали выраженного на активность А1-ПИ, однако, в целом соотношение «эластаза/А1-ПИ» уменьшалось, при этом увеличивалось содержание коллагена в легких. Можно заключить, что при введении витамина А происходит подавление протеолитических процессов в легких. Кроме того, известно, что ретиноиды являются индукторами синтеза эластина и коллагена. Этим может объясняться тот факт, что уровень коллагена у опытных животных с коррекцией ретиноидами был выше, чем у контрольных животных.

Выводы:

1. На ранних сроках воздействия гипероксии (3 суток) обнаружена высокая активность А1-ПИ и содержание коллагена в ткани легкого новорожденных животных. Содержание нейтрофильной эластазы не изменяется по сравнению с контрольной группой животных.

2. При длительной гипероксии (14 суток) у новорожденных животных увеличивается содержание нейтрофильной эластазы и уменьшается содержание коллагена в гомогенатах легких, что свидетельствует о стимуляции протеолитических процессов в ткани.

3. Ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом животным, подвергшимся длительному воздействию гипероксии, способствовало увеличению активности А1-ПИ, уменьшению содержания нейтрофильной эластазы и увеличению содержания коллагена в ткани легких новорожденных морских свинок.

Литература

1. Bates, M. Ventilatory control in infants, children, and adults with bronchopulmonary dysplasia / M. Bates, D. Pillers, M. Palta – *Respir Physiol Neurobiol.*, 2013. – P. 329-337.
2. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency / D. L. Demeo [et al.] – *Thorax*, 2007. – Vol. 62, № 9. – P. 804-813.
3. Vitamin A and retinoid acid act synergistically to increase lung retinyl esters during normoxia and reduce hyperoxic lung injury in newborn mice / M. L. James, A. C. Ross, A. Bulger [et al.] – *Pediatr. Res.* – 2010. – Vol. 67 (6). – P. 591-597.
4. Овсянников, Д. Ю. Бронхолегочная дисплазия / Д. Ю. Овсянников, Н. А. Геппе, А. Б. Малахов. – М.: Монография, 2020. – 175 с.