

Р.М. Саттаров, А.С. Матюхевич

**ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА СОСТОЯНИЕ
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ
МОРСКИХ СВИНОК С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИЕЙ**

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

Кафедра биологической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

R.M. Sattarov, A.S. Matyukhevich

**INFLUENCE OF N-ACETYLCYSTEINE ON THE STATE
OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE LUNGS OF NEWBORN
GUINEA PIGS WITH EXPERIMENTAL HYPEROXIA**

Tutor: PhD, associate professor Zh.A. Rutkovskaya

Department of Biological Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Введение липосом, содержащих N-ацетилцистеин, нормализует состояние оксидантно-антиоксидантной системы в легких новорожденных морских свинок со смоделированной гипероксией.

Ключевые слова: новорожденные морские свинки, N-ацетилцистеин, гипероксия.

Resume. The introduction of liposomes containing N-acetylcysteine normalizes the state of the oxidant-antioxidant system in the lungs of newborn guinea pigs with modeled hyperoxia.

Keywords: newborn guinea pigs, N-acetylcysteine, hyperoxia.

Актуальность. Бронхолегочная дисплазия (БЛД) – это хроническое заболевание, развивающиеся у недоношенных детей из-за поражения легких при проведении искусственной вентиляции легких с высокими концентрациями кислорода. Симптомами БЛД являются тахипноэ, диспноэ, гипоксемия, стойкая обструкция легочных тканей. Одним из факторов патогенеза БЛД является повреждающее действие кислорода на ткани легких. Считается, что это связано с образованием супероксидных радикалов и пероксидных соединений. Данные активные формы кислорода повреждают мембраны клеток, разрушают сурфактант легких, сульфгидрильные группы ферментов ДНК, что приводит к гибели клеток. На развитие заболевания влияют не только концентрация кислорода и длительность оксигенотерапии, но и состояние антиоксидантной системы (глутатионпероксидаза, каталаза и др.) у новорожденных. У недоношенных детей концентрация данных веществ низкая, поскольку развитие антиоксидантной системы происходит в течение третьего триместра беременности и, следовательно клеточные структуры легких плохо защищены от воздействия активных форм кислорода [1].

Принимая во внимание вышесказанное, логично предположить, что в качестве одного их компонентов патогенетической терапии и профилактики развития БЛД можно использовать антиоксиданты. При лечении инфекций дыхательной системы в клинической практике широко используется низкомолекулярное тиолсодержащее вещество N-ацетилцистеин. Это соединение оказывает не только прямое антиоксидантное действие, нейтрализуя активные формы кислорода, причем наиболее эффективно – гидроксильный радикал и гипохлорную кислот [2], но и

увеличивает внутриклеточного содержания восстановленного глутатиона, который, в свою очередь, принимает участие в регуляции процессов внутриклеточной сигнализации и экспрессии генов [3].

При респираторных заболеваниях эффективным средством доставки веществ к клеткам эпителия альвеол могут быть липосомы в форме аэрозоля. Экспериментальные данные указывают на то, что ингаляционное введение липосом не оказывает негативного влияния на функциональные показатели легких, хорошо переносится и не дает побочных эффектов [4]. Липосомы являются биосовместимыми, биodeградируемыми и нетоксичными. Липосомы лучше транспортируют вещества в клетки и увеличивают продолжительность их действия. Липосомная форма, по нашему мнению, может повысить эффективность препаратов на основе N-ацетилцистеина.

Цель: изучить влияние липосом, содержащих N-ацетилцистеин на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы в легких новорожденных морских свинок с экспериментальной гипероксией.

Задачи:

1. Изучить влияние кратковременной (3 суток) и длительной (14 суток) гипероксии на содержание продуктов перекисного окисления липидов и белков, токоферола, небелковых SH-соединений и активность глутатионпероксидазы в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) новорожденных животных.

2. Установить характер влияния липосом с N-ацетилцистеином на содержание продуктов перекисного окисления липидов и белков, токоферола, небелковых SH-соединений и активность глутатионпероксидазы в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) новорожденных животных с экспериментальной гипероксией.

Материалы и методы. Эксперимент проводили с использованием новорожденных морских свинок, находившихся на стандартном рационе вивария БГМУ. При выполнении данного исследования строго соблюдали нормы биомедицинской этики. Для создания условий гипероксии животных в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которую постоянно подавали кислород. Концентрацию кислорода поддерживали на уровне не менее 70%. Длительность воздействия гипероксии составляла 3 суток и 14 суток. В течение дня камеру один раз открывали для чистки клетки, кормления животных и проведения ингаляций в соответствующих группах. Животные контрольной группы дышали обычным воздухом.

Использовали 4 группы животных: 1 группа – интактные животные; 2 группа – интактные животные, которые получали ингаляционно N-ацетилцистеин (250 мг/кг в 0,1 М фосфатном буфере, ингаляции проводили 1 раз в двое суток с помощью компрессорного небулайзера); 3 группа – животные, которые подверглись воздействию гипероксии (новорожденных животных помещали в плексигласовую камеру, где поддерживали концентрацию кислорода не менее 70%); 4 группа – животные, которые во время воздействия гипероксии получали ингаляционно N-ацетилцистеин (ингаляции проводили тем же раствором и с той же частотой, что и в группе 2). По окончании эксперимента животных наркотизировали тиопенталом натрия (15 мг/кг) и для исследования получали бесклеточный супернатант бронхоальвеолярной лаважной жидкости, в котором определяли активность

глутатионпероксидазы (ГП), содержание восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений, токоферола, а также содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты), диеновых конъюгатов (ДК), оснований Шиффа (ОШ) и карбонильных производных белков.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0. Проведение анализа осуществлялось с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и непараметрического U-теста Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Непродолжительная гипероксия в течение 3 суток приводила к снижению активности ГП на 57% ($p < 0,05$) и снижению содержания токоферола более чем на 42% по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Содержание небелковых SH-соединений достоверно не изменялось (таблица 1). На этом фоне выявлено значительное увеличение содержания продуктов перекисного окисления белков и липидов: содержание диеновых конъюгатов увеличилось в 2,8 раза ($p < 0,05$), а карбонильных производных белков – 4,6 раза ($p < 0,05$).

Табл. 1. Влияние N-ацетилцистеина на содержание продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в БАЛЖ новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

Показатель	Группа		Без коррекции	+ N-АЦ _{лип.}
Диеновые конъюгаты, е.и.о.	3 суток	контроль	1,32 (1,00 – 1,38)	1,54 (1,16 – 1,77)
		гипероксия	3,69 (2,21 – 4,37)*	2,92 (1,9 – 4,1)*
	14 суток	контроль	2,18 (1,45 – 2,42)	2,36 (2,10 – 2,69)
		гипероксия	3,66 (2,06 – 4,3)*	0,75(0,75 – 0,78)*^
Продукты, реагирующие с ТБК, нмоль/мкмоль общего липидного фосфора	3 суток	контроль	8,93 (8,16 – 15,3)	4,72 (4,44 – 4,99)*
		гипероксия	12,27 (10,37 – 20,37)	10,30 (9,30 – 15,21)
	14 суток	контроль	4,52 (3,75 – 7,39)	6,97 (6,54 – 7,76)
		гипероксия	8,67 (5,25 – 18,45)*	2,34 (1,88 – 3,29)*^
Основания Шиффа, е.и.о.	3 суток	контроль	0,29 (0,24 – 0,30)	0,18 (0,12 – 0,26)
		гипероксия	0,36 (0,27 – 0,92)	0,28 (0,18 – 0,35)
	14 суток	контроль	0	0,01 (0,01 – 0,05)
		гипероксия	0,75 (0,63 – 0,90)*	0,08 (0,08 – 0,11)*^
Карбонильные производные, нмоль/мг белка	3 суток	контроль	13,18 (10,69 – 37,62)	6,38 (1,23 – 6,38)
		гипероксия	60,09 (26,04 – 73,57)*	65,82 (60,29 – 71,66)
	14 суток	контроль	24,23 (20,58 – 25,95)	19,97 (18,31 – 22,47)
		гипероксия	33,09 (14,39 – 46,25)	36,61 (31,47 – 39,94)

Примечание – * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «контроль без коррекции» (на сером фоне), ^ - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой «гипероксия без коррекции» (на сером фоне). N-АЦ_{лип.} – липосомы с N-ацетилцистеином.

В свою очередь при длительной гипероксии (14 суток) вышеуказанные показатели не только не нормализовались, но и возросло содержание продуктов, реагирующих с ТБК, и оснований Шиффа в 1,9 раза ($p < 0,05$) и 2,3 раза ($p < 0,05$) соответственно (таблица 1). В эти же сроки гипероксии активность ГП снизилась более чем на 69% ($p < 0,05$) (таблица 2).

Таким образом, повреждение белков (увеличение карбонильных производных), в том числе ферментов (в нашем исследовании – глутатионпероксидазы) при непродолжительной гипероксии привело к накоплению продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-активных продуктов, ДК и ОШ) снижению содержания небелковых SH-соединений в легких новорожденных морских свинок.

Табл. 2. Влияние N-ацетилцистеина на содержание антиоксидантов в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

Показатель	Группа		Без коррекции	+ N-АЦ _{лип.}
	3 суток	контроль	61,2 (40,4 – 89,3)	73,2 (62,0 – 81,9)
Небелковые SH-соединения в БАЛЖ, нмоль/мг белка	3 суток	гипероксия	84,4 (63,7 – 112,4)	83,5 (57,0 – 110,0)
		14 суток	контроль	111,7 (60,2 – 178,6)
	гипероксия		75,8 (36,7 – 121,3)*	102,1 (92,2 – 115,6)^
	Глутатионпероксидаза в БАЛЖ, нмоль/мин/мг белка	3 суток	контроль	86,5 (62,8 – 99,0)
гипероксия			37,2 (12,1 – 65,5)*	70,4 (37,1 – 103,7)
14 суток		контроль	49,5 (29,5 – 62,1)	53,4 (45,8 – 82,3)
		гипероксия	15,2 (0 – 20,2)*	31,2 (18,4 – 49,4)^
Токоферол, нмоль/мг белка/г ткани	3 суток	контроль	296,3 (222,1 – 410,9)	122,4 (106,6 – 172,4)*
		гипероксия	170,7 (152,7 – 250,6)*	143,3 (134,4 – 149,0)*
	14 суток	контроль	305,4 (218,2 – 367,2)	154,5 (149,4 – 188,2)*
		гипероксия	188,3 (133,4 – 314,4)*	236,5 (232,0 – 241,2)

Ингаляционное введение липосом, содержащих N-ацетилцистеин, приводило к увеличению активности ГП в 2 раза ($p < 0,05$) и небелковых SH-соединений в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой, где животные подвергались гипероксии без коррекции (табл.2). Концентрация токоферола у животных с коррекцией N-ацетилцистеином статистически достоверно не изменялась в сравнении с группой «гипероксия без коррекции». На фоне активации системы антиоксидантной защиты после введения N-ацетилцистеина у животных, подвергшихся воздействию гипероксии, снизилось содержание продуктов свободно-радикального окисления. Так, содержание ДК, ОШ и ТБК-активных продуктов достоверно ($p < 0,05$) уменьшилось в 4,8 раза, в 9 раз и в 3,7 раза соответственно.

Выводы:

1. Воздействие гипероксии активизирует процессы свободно-радикального окисления в тканях легкого новорожденных животных, что выражается в снижении активности антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы) и количества небелковых SH-соединения на фоне увеличения продуктов перекисной окисления липидов и белков (ТБК-зависимых продуктов, оснований Шиффа и диеновых конъюгатов). Причем наиболее чувствительны к воздействию гипероксии фермент глутатионпероксидаза.

2. При увеличении продолжительности воздействия гипероксии нарушения в системе оксиданты-антиоксиданты прогрессируют: состояние антиоксидантной системы ухудшается и количество перекисных продуктов в БАЛЖ нарастает.

3. Ингаляционное введение липосом, содержащих N-ацетилцистеин, эффективно корригирует изучаемые показатели: увеличивается активность глутатионпероксидазы и концентрация небелковых SH-соединений и нормализуется

содержание продуктов перекисного окисления липидов и белков в БАЛЖ новорожденных морских свинок в условиях длительной (14 суток) гипероксии.

4.

Литература

1. Павлинова Е. Б. Бронхолегочная дисплазия: современное состояние проблемы / Павлинова Е. Б. // Омский научный вестник. – 2011. - № 1. – С. 37–40.
2. Adhassi, E. Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions / E. Adhassi, J. P. Allard // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28, N 6. – P. 880-886.
3. Роль N-ацетилцистеина в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии / Носарева О.Л., Орлов Д.С., Шахристова Е.В. и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2020. - № 19(3). – С. 102–108.
4. Thomas D.A., Myers M.A., Wichert B., Schreier H., Gonzalez-Rothi R.J. / Acute effects of liposome aerosol inhalation on pulmonary function in healthy human volunteers // Chest. – 1991. - № 99(5). – P. 1268–1270.