

И.Л. Котович

Изменение оксидантно-антиоксидантного статуса легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии под влиянием липосом, содержащих альфа-токоферол
Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
кафедра биологической химии

Защита легких от токсического действия кислорода является важным аспектом при оказании помощи новорожденным, родившимся с низкой и экстремально низкой массой тела и нуждающимся в интенсивной терапии с использованием высоких концентраций кислорода и искусственной вентиляции, в особенности, если такая терапия проводится длительно. Воздействие гипероксии рассматривают как один из факторов, способствующих развитию тяжелой хронической патологии – бронхолегочной дисплазии (БЛД). Механизм повреждающего действия высоких концентраций кислорода на легкие окончательно не установлен, однако общепризнанной является гипотеза о стимуляции свободнорадикальных процессов и развитии оксидативного стресса [2]. Поскольку в настоящее время не существует эффективных способов профилактики БЛД, актуальным направлением современных медицинских исследований является изучение метаболических нарушений в легких, вызванных воздействием гипероксии, а также поиск способов их коррекции. Учитывая тот факт, что усиление генерации свободных радикалов в условиях гипероксии действительно имеет место [1], представляется перспективным исследование эффективности антиоксидантов для предотвращения токсического действия кислорода на легкие.

Целью настоящего исследования было изучить влияние липосом, содержащих α -токоферол, при их ингаляционном введении на продукцию активных форм кислорода, активность антиоксидантных ферментов и содержание продуктов пероксидации липидов и белков в легких новорожденных морских свинок, подвергавшихся длительному воздействию гипероксии.

Материалы и методы: в эксперименте использовались новорожденные морские свинки, находившиеся на стандартном рационе вивария БГМУ. Исследование проводилось с соблюдением этических норм и правил проведения работ с лабораторными животными. Животных опытных групп в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации (14 суток) поддерживали концентрацию кислорода не менее 70%. Контрольные животные в течение такого же

периода времени дышали обычным воздухом. В каждой экспериментальной группе находилось 4-5 животных.

Изучали эффективность ингаляционного введения липосом, содержащих α -токоферол, для коррекции оксидантно-антиоксидантного статуса легких. Для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь мультиламеллярных липосом, содержащих α -токоферол (12,5 мг/кг) (Sigma, США), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ, 44 мг/кг) (Sigma, США) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4. Для приготовления липосом в спиртовой раствор ДПФХ (35 мг/мл) вносили хлороформный раствор α -токоферола (10 мг/мл) и полученную смесь упаривали до получения сухой липидной пленки, к которой добавляли 1 мл натрий-фосфатного буфера (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4 и встряхивали на миксере Maxi-Mix 1 (Thermolyne, США) до образования однородной дисперсии. Полученные липосомы инкубировали 1 час при 40°C и использовали для приготовления ингаляционной смеси. Ингаляции проводили с помощью компрессорного небулайзера (Omron, Китай) 1 раз в два дня, всего 7 раз в течение 14 суток воздействия гипероксии. По окончании эксперимента животных наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально) и получали материал для исследования не ранее, чем через 22 часа после последнего введения препарата.

В качестве материала для исследования использовали бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ). Для получения БАЛЖ проводили промывание легких через эндотрахеальный зонд трижды по 8 мл раствором 0,9% NaCl. Полученную БАЛЖ центрифугировали при 200 g, 4°C (рефрижераторная центрифуга РС-6, Кыргызстан) для осаждения клеток. Определяли следующие показатели: интенсивность генерации активных форм кислорода (АФК) клетками БАЛЖ (методом люминолзависимой хемилюминесценции, ЛЗХЛ), активность основных антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза), содержание карбонильных производных аминокислотных остатков в белках, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), диеновых конъюгатов, оснований Шиффа в БАЛЖ.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8,0. Сравнение выборок, распределение которых было отличным от нормального, проводили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни (U-тест). 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 исследования. Интегральная интенсивность ЛЗХЛ клеток БАЛЖ животных, подвергавшихся воздействию гипероксии, была повышена, в среднем, на 86% по сравнению с показателями в контрольной группе (табл. 1, $p < 0,05$). При этом обращала на себя внимание менее выраженная реакция клеток на стимуляторы (липополисахарид и латекс), которая составила, в среднем, 68% и 72% от контрольных значений, соответственно ($p < 0,05$). По нашему мнению, полученные результаты отражают снижение иммунореактивности клеток, что может способствовать развитию инфекционных осложнений при длительном использовании высоких концентраций кислорода. В группе животных, которым вводили липосомы с α -токоферолом на фоне гипероксии, общая интенсивность ЛЗХЛ достоверно не отличалась от группы «гипероксия», а ответ клеток на стимуляторы был значительно выше: при стимуляции латексом значимо не отличался от контроля, а при использовании липополисахарида даже превышал контрольные значения, в среднем, на 88% ($p < 0,05$). Примечательно, что аналогичный эффект был обнаружен при введении липосом с α -токоферолом контрольным животным. Полученные данные свидетельствуют о том, что α -токоферол в составе липосом при ингаляционном введении оказывает иммуномодулирующее действие на клетки в легких, что согласуется с данными литературы о стимулирующем влиянии токоферола на клеточно-опосредованные иммунные реакции [3].

Таблица 1. Влияние липосом с α -токоферолом на продукцию активных форм кислорода клетками БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергавшихся воздействию гипероксии

Показатель	Контроль	Контроль + α -ТФ	Гипероксия	Гипероксия + α -ТФ
Интегральная интенсивность ЛЗХЛ, отн.ед.	13,0 (11,1 – 14,2)	19,1 (14,1 – 24,7)	24,3 (14,6 – 27,3)*	28,2 (27,5 – 29,3)*
Интенсивность ЛЗХЛ в ответ на адгезию, отн.ед.	5,6 (4,5 – 7,5)	8,1 (7,2 – 10,2)	16,7 (10,9 – 20,4)*	18,1 (16,6 – 19,7)
Интенсивность ЛЗХЛ в ответ на липополисахарид (5 мкг/мл), отн.ед.	2,5 (1,9 – 2,9)	5,8 (4,8 – 6,8)*	1,7 (1,3 – 2,2)*	4,7 (3,9 – 5,2)*^
Интенсивность ЛЗХЛ в ответ на латекс (50 мкл 1/50), отн.ед.	4,6 (3,9 – 6,5)	7,1 (6,4 – 7,9)*	3,3 (2,1 – 4,3)*	5,9 (5,2 – 6,7)^

Примечание – В таблицах 1-3: α -ТФ – α -токоферол; * - $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; ^ - $p < 0,05$ по сравнению с группой «гипероксия».

Данные исследования содержания продуктов перекисного окисления белков (ПОЛ) и окислительной модификации белков в БАЛЖ представлены в таблице 2. При длительном

воздействии гипероксии концентрации диеновых конъюгатов, ТБК-реактивных продуктов и оснований Шиффа в БАЛЖ достоверно увеличивались. Уровень карбонильных производных аминокислот также имел тенденцию к росту. На фоне введения липосом, содержащих α -токоферол, у животных, находившихся в условиях гипероксии, выявлена тенденция к снижению уровня диеновых конъюгатов, а количество оснований Шиффа и карбонильных производных по сравнению с опытной группой «гипероксия» достоверно уменьшилось.

Таблица 2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных аминокислот в белках в БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергавшихся воздействию гипероксии и получавших ингаляции липосом с α -токоферолом

Группа	Диеновые конъюгаты	Продукты, реагирующие с ТБК	Основания Шиффа	Карбонильные производные
Контроль	2,2 (1,5 – 2,4)	4,5 (3,7 – 7,3)	0	24,2 (20,6 – 25,9)
Контроль + α -ТФ	1,3 (1,2 – 1,4)*	4,8 (3,8 – 5,3)	0,01 (0,009 – 0,01)	17,5 (16,1 – 18,9)
Гипероксия	3,6 (2,1 – 4,3)*	8,7 (5,2 – 18,4)*	0,8 (0,6 – 0,9)*	33,1 (14,4 – 46,2)
Гипероксия + α -ТФ	2,5 (2,2 – 2,8)	8,2 (6,4 – 8,9)	0,4 (0,2 – 0,7)*^	15,5 (13,1 – 20,2)^

Примечание – Данные о содержании продуктов липопероксидации представлены в пересчете на содержание общего липидного фосфора в БАЛЖ; карбонильных производных аминокислот – в нмоль/мг белка/мл БАЛЖ.

Уровень продуктов, реагирующих с ТБК, оставался повышенным, что, однако, может не соответствовать истинному содержанию продуктов ПОЛ в БАЛЖ. Традиционно считается, что данный показатель отражает содержание вторичного продукта ПОЛ малонового диальдегида, однако известно, что с ТБК реагируют и другие альдегиды и кетоны, источниками которых могут быть не только процессы липопероксидации. В рамках проведенного исследования мы не можем исключить влияния иных компонентов, кроме малонового диальдегида, на уровень ТБК-реагирующих продуктов. В связи с этим было бы неправомерно расценить полученный результат как отсутствие эффекта от введения липосом.

В целом α -токоферол проявил ожидаемые эффекты как липофильный антиоксидант в плане уменьшения окислительного повреждения липидов. Кроме того, как показывает уровень карбонильных производных аминокислот, окислительная модификация белков в БАЛЖ животных, находившихся в условиях гипероксии и получавших ингаляции с токоферолом, также значительно снижалась. Данный эффект может быть обусловлен ростом активности глутатиопероксидазы на фоне введения липосом с α -токоферолом (табл. 3).

Достоверных изменений со стороны активности СОД и каталазы в БАЛЖ животных под влиянием гипероксии и α -токоферола выявлено не было.

Таблица 3. Влияние липосом с α -токоферолом на активность антиоксидантных ферментов в БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергавшихся воздействию гипероксии

Показатель	Контроль	Контроль + α -ТФ	Гипероксия	Гипероксия + α -ТФ
Глутатионпероксидаза, нмоль/мин/мг белка	49,5 (29,5 – 62,1)	95,2 (36,5 – 133,1)	15,2 (0 – 20,2)*	68,1 (62,5 – 78,1)^
СОД, мЕ/мг белка	44,2 (38,7 – 52,9)	55,8 (45,9 – 66,0)	42,8 (35,5 – 57,1)	37,6 (27,9 – 38,4)
Каталаза, мЕ/мг белка	256,6 (189,6 – 322,2)	181,8 (124,3 – 188,0)	189,2 (155,8 – 247,2)	258,6 (251,1 – 262,3)

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. На фоне ингаляционного введения липосом, содержащих α -токоферол, уровень продуктов пероксидации липидов (оснований Шиффа) и белков (карбонильных производных аминокислот) в БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергавшихся воздействию длительной гипероксии, уменьшается, в среднем в 2 раза, а активность глутатионпероксидазы увеличивается (в 4,5 раза), $p < 0,05$.
2. Интегральная интенсивность продукции активных форм кислорода клетками БАЛЖ животных, находившихся в условиях гипероксии и получавших ингаляции липосом с α -токоферолом, достоверно не изменяется по сравнению с группой животных без коррекции, а ответ клеток на стимуляторы усиливается и достигает контрольных значений (латекс) или даже превышает их (липополисахарид), что, вероятно, является следствием иммуномодулирующего действия α -токоферола.

Литература:

1. Котович, И.Л. Продукция активных форм кислорода и азота клетками бронхоальвеолярной лаважной жидкости в условиях экспериментальной гипероксии / И.Л. Котович, Ж.А. Рутковская, А.Д. Таганович // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук – 2012. - № 2 – с. 70-77.
2. Шишко, Г.А. Современные подходы к ранней диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии: учебно-методическое пособие для врачей / Г.А. Шишко, Ю.А. Устинович // Мн.: БелМАПО. – 2006. – 25 с.
3. Pekmezci, D. Vitamin E and immunity / D. Pekmezci // Vitam. Horm. – 2011. – Vol.86. – P.179 – 215.

Summary

I.L. Katovich

Changes in lung oxidant-antioxidant status of hyperoxia-exposed newborn guinea pigs under the influence of liposomes containing α -tocopherol

The aim of the present research was to study the influence of aerosolized liposomes containing α -tocopherol on the production of reactive oxygen species (ROS), activity of antioxidant enzymes and content of lipid and protein peroxidation products in lungs of newborn guinea pigs exposed to prolonged hyperoxia.

Inhalations of liposomes with α -tocopherol in hyperoxia-exposed animals cause the level of Schiff bases and protein carbonyls in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) to decrease, and the activity of glutathione peroxidase to enhance. The intensity of ROS production by BALF cells in response to stimuli increases and attains control values (latex) and even exceeds them (lipopolysaccharide), probably, due to the immunomodulatory effect of α -tocopherol.