

ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛ, НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АЗОТА КЛЕТКАМИ ЛЕГКИХ ПРИ ГИПЕРОКСИИ

Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Ковалева Д.В., Таганович А.Д.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) является тяжелой хронической патологией, которая развивается у недоношенных новорожденных с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. Экспериментальное моделирование БЛД на животных в условиях гипероксии широко используется для изучения патогенетических механизмов и разработки способов профилактики данной патологии [1]. Тем не менее, фармакологические подходы, которые позволили бы эффективно препятствовать развитию БЛД, до настоящего времени не разработаны. С учетом того, что свободнорадикальное окисление считается одним из ведущих повреждающих факторов при БЛД, весьма актуальным является изучение возможности коррекции молекулярно-клеточных нарушений в легких новорожденных с помощью антиоксидантов.

Цель исследования – изучить влияние липосом, содержащих α -токоферол, при их ингаляционном введении на клеточный состав и продукцию активных форм кислорода и азота клетками бронхоальвеолярной жидкости в условиях экспериментальной гипероксии.

Материалы и методы

В эксперименте использовались новорожденные морские свинки. Были сформированы группы «контроль», «контроль + α -токоферол», «гипероксия», «гипероксия + α -токоферол». Контрольные животные дышали обычным воздухом; животных опытных групп («гипероксия») в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70%. Длительность наблюдения составляла 3 и 14 суток. Липосомальную суспензию, содержащую α -токоферол (12,5 мг/кг), дипальмитоилфосфатидилхолин (44 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), рН=7,4, готовили непосредственно перед использованием и вводили ингаляционно с помощью компрессорного небулайзера (Omron, Китай) 1 раз в два дня. В качестве материала для исследования использовали клетки, выделенные из бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) и бесклеточный супернатант. Клеточный состав БАЛЖ оценивали после приготовления мазков и окраски по Романовскому-Гимзе. Интенсивность продукции активных форм кислорода клетками БАЛЖ изучали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) в

отсутствие дополнительных стимуляторов (при адгезии), а также при добавлении липополисахарида (ЛПС) и латекса. О продукции NO судили по концентрации нитрит-ионов (стабильных метаболитов NO) в БАЛЖ и среде культивирования клеток БАЛЖ. Содержание нитритов определяли с помощью реактива Грисса.

Для статистического анализа результатов использовали U-тест Манна-Уитни (Statistica 6.0), отличия между группами считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У новорожденных морских свинок при гипероксии в БАЛЖ относительное содержание нейтрофилов увеличивалось по мере увеличения длительности гипероксии: на 3 сутки оно составляло 8,0 (7,0–10,0)%, тогда как на 14 сутки – 17,5 (15,5–25,0)%, что достоверно выше чем в соответствующих контрольных группах (1,0 (1,0–2,0)% и 1,5 (0–2,0)%, соответственно). Длительная гипероксия (14 суток) сопровождалась значительным увеличением концентрации общего белка в БАЛЖ (в 1,9 раза, $p < 0,05$), что, в совокупности с данными, характеризующими клеточный состав, можно рассматривать как признак развивающейся воспалительной реакции с преимущественным вовлечением нейтрофилов. Введение липосом с α -токоферолом на фоне гипероксии не оказывало существенного влияния на клеточный состав БАЛЖ, а концентрация белка в БАЛЖ в группе «гипероксия + α -токоферол» на 14 сутки была увеличена в 2,7 раза по сравнению с контролем, что достоверно превышало показатели в соответствующей группе «гипероксия».

Интенсивность не стимулированной продукции АФК клетками БАЛЖ (при адгезии) увеличивалась на 3-и сутки гипероксии до 273% от контроля ($p < 0,05$) и оставалась неизменно повышенной в дальнейшем, тогда как интенсивность клеточного ответа на стимуляторы значительно изменялась. При увеличении длительности гипероксии свыше 3 суток реакция на все виды стимуляции достоверно уменьшалась и в группе «14 суток» оказалась даже ниже, чем в контроле (на 32,8% при внесении липополисахарида (ЛПС) и на 27,4% при внесении латекса, $p < 0,05$).

Количество нитрит-ионов в БАЛЖ животных в группе «гипероксия 3 суток» достоверно превышало контрольные значения, в среднем, в 2,8 раза ($p < 0,05$). На 14-е сутки воздействия гипероксии у животных отмечалось достоверное снижение концентрации нитритов в БАЛЖ. Аналогичные результаты были получены относительно изменения уровня нитритов в среде культивирования клеток БАЛЖ.

При введении липосом, содержащих α -токоферол, на фоне непродолжительной гипероксии (3 суток) снижалась интенсивность ЛЗХЛ клеток БАЛЖ при адгезии, в среднем, в 2 раза ($p < 0,05$), ответ клеток на введение ЛПС также снижался по сравнению с группой «гипероксия 3 суток» (при этом данные статистически не отличались от показателей в контрольной

группе). Уровень нитрит-ионов в БАЛЖ животных после введения липосом с витамином Е не превышал уровень контроля.

При введении липосом с α -токоферолом на фоне длительной гипероксии (14 суток) продукция АФК при адгезии клетками БАЛЖ новорожденных животных, находившихся в условиях гипероксии, была выше, чем в контроле (примерно в 3,2 раза, $p < 0,05$), и достоверно не отличалась от группы «гипероксия». При этом отсутствовало подавление клеточного ответа на стимуляторы, имеющее место при изолированном действии гипероксии: интенсивность реакции клеток на латекс значимо не отличалась от контроля, а при стимуляции ЛПС даже превышала контрольные значения, в среднем, на 88% ($p < 0,05$). Примечательно, что аналогичный эффект был обнаружен при введении липосом с α -токоферолом контрольным животным, что может быть проявлением иммуномодулирующего эффекта витамина Е на клетки легких [2]. Изменения уровня нитрит-ионов в БАЛЖ при использовании данного способа коррекции по сравнению с группой «гипероксия» не выявлено.

Таким образом, ингаляционное введение липосом с α -токоферолом не оказывает существенного влияния на клеточный состав БАЛЖ, но сопровождается уменьшением продукции активных форм кислорода и азота клетками легких на фоне относительно непродолжительной гипероксии (3 суток). При введении липосом, содержащих витамин Е, на фоне длительной гипероксии (14 суток) уровень нитрит-ионов в БАЛЖ и генерация АФК клетками в ответ на адгезию достоверно не изменяются, а интенсивность клеточной реакции на введение стимуляторов фагоцитоза увеличивается до уровня контрольных значений.

Литература:

1. Hussain N., Wu F., Christian C., Kresch M.J. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. -1997. Vol. 273 (17). -P. L726-L732.
2. Pekmezci D. // Vitam. Horm. -2011. -Vol.86. -P.179- 215.

EFFECT OF LIPOSOMAL ALPHA-TOCOPHEROL ON PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES BY THE LUNG CELLS IN HYPEROXIA

Katovich I.L., Rutkovskaya Z.A., Kovaleva D.V., Tahanovich A.D.

We studied the influence of aerosolized liposomes containing α -tocopherol on the production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) by bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells obtained from newborn guinea pigs exposed to prolonged hyperoxia.

Inhalations of liposomes with α -tocopherol in hyperoxia-exposed animals didn't change the BALF cell composition, but caused the intensity of ROS and RNS production by BALF cells to decrease in groups exposed to hyperoxia for 3 days. In groups exposed to hyperoxia for 14 days the non-stimulated ROS and RNS production was not affected by introduction of liposomal α -tocopherol, the response to stimuli (latex and lipopolysaccharide) increased and attained control values, probably, due to the immunomodulatory effect of α -tocopherol.