

ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОЛИПИДНОГО И БЕЛКОВОГО КОМПОНЕНТОВ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИИ

Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Стовба А.А., Кончиц Е.С., Таганович А.Д.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск*

Использование высокой концентрации кислорода во вдыхаемой смеси при искусственной вентиляции легких рассматривается как одна из причин развития бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей. Фосфолипиды сурфактанта легких и белки, расположенные внеклеточно, в первую очередь могут повреждаться в условиях гипероксии. В настоящем исследовании в условиях эксперимента выявлено значительное снижение уровня фосфолипидов сурфактанта, уменьшение активности фосфолипазы A_2 , увеличение содержания окисленных липидов и продуктов окислительной модификации белков в бронхоальвеолярной жидкости под влиянием длительной гипероксии.

Ключевые слова: гипероксия, бронхоальвеолярная жидкость, фосфолипиды, белки.

Введение

Сурфактант легких представляет собой поверхностно-активный комплекс липидов и белков, покрывающий внутреннюю поверхность альвеол и препятствующий спадению альвеол на выдохе. Основу сурфактанта составляют фосфолипиды (85%), которые отвечают за уменьшение поверхностного натяжения на границе раздела фаз жидкость/воздух, а также имеют ряд иммуномодулирующих свойств. Синтез, секрецию и реутилизацию (рециклизацию) сурфактанта осуществляют альвеолоциты II типа. В катаболизме сурфактантных липидов и белков важную роль играют также альвеолярные макрофаги. Продуцируемая ими секреторная фосфолипаза A_2 вносит основной вклад в разрушение фосфолипидов во внеклеточном пространстве [1].

Известно, что система легочного сурфактанта играет важную роль не только в нормальном функционировании легких, но и в развитии легочных заболеваний (пневмофиброз, саркоидоз и др.). Особое значение имеет состояние сурфактантной системы у недоношенных новорожденных, поскольку синтез и секреция компонентов сурфактанта в период гестации увеличивается, полностью достигая функционально зрелого уровня лишь к 36 неделе.

В настоящее время растет количество недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. Выхаживание таких новорожденных невозможно без использования искусственной вентиляции легких с высокой концентрацией кислорода во вды-

хаемой смеси. Однако, в большинстве случаев у таких детей впоследствии развивается тяжелое хроническое заболевание – бронхолегочная дисплазия. Одним из факторов, провоцирующих развитие бронхолегочной дисплазии, наряду с незрелостью тканей легких, баротравмой и волюмотравмой (при использовании неадекватных параметров искусственной вентиляции), может являться токсическое действие высоких доз кислорода. Считается, что гипероксия провоцирует увеличение продукции активных форм кислорода и возникновение окислительного стресса. Для такого состояния характерным является усиление перекисного окисления липидов, однако, в условиях гипероксии не было выявлено накопления продуктов липопероксидации в легких [2].

Учитывая функциональную важность сурфактантной системы у новорожденных, а также тот факт, что сурфактант, располагаясь внеклеточно, может в первую очередь повреждаться под действием активных форм кислорода, целью настоящего исследования стало изучить в эксперименте характер изменения фосфолипидного состава сурфактанта и оценить степень окислительного повреждения липидов и белков в бронхоальвеолярном пространстве в динамике длительной гипероксии.

Материалы и методы

В работе использовались новорожденные морские свинки, которые находились на стандартном рационе вивария БГМУ. Эксперимент проводили 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 75% (температура 20-25°C, относительная влажность 50-80%). Длительность инкубации в условиях гипероксии составляла 3, 7 и 14 суток. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. По окончании инкубации животных обеих групп наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально) и проводили промывание легких через эндотрахеальный зонд раствором 0,9% NaCl (3×8 мл). В полученной бронхоальвеолярной лаважной жидкости определяли содержание основных сурфактантных фракций фосфолипидов, общего белка, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (малонового диальдегида и др.), карбонильных производных белков, активность фосфолипазы A₂. Степень разведения бронхоальвеолярной жидкости оценивали по содержанию мочевины и учитывали при расчетах. Содержание ТБК-активных продуктов и карбонильных производных в белках определяли также в гомогенатах легких.

Общий белок определяли по методу Lowry и выражали в мкг/мл бронхоальвеолярной жидкости.

Определение фосфолипидов. Липиды экстрагировали из бронхоальвеолярной лаважной жидкости по методу Folch. Разделение фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии с использованием смеси хлороформ/метанол/вода (65/25/4, v/v/v). Получали следующие фракции: фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин, суммарную фракцию фосфатидилэтаноламина. Содержание динасыщенного фосфатидилхолина определяли методом двумерной хроматографии. Количественный учет фосфолипидов осуществляли по содержанию липидного фосфора. Содержание отдельных фосфолипидов и общего липидного фосфора выражали в мкмоль фосфора/мг белка/мл бронхоальвеолярной жидкости.

Определение ТБК-активных продуктов проводили для оценки интенсивности процессов перекисного окисления липидов. Метод основан на взаимодействии малонового диальдегида с ТБК с образованием триметинового комплекса розового цвета. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически при 532 нм. При расчете использовали коэффициент молярной экстинкции, равный $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, содержание выражали в нмоль/мг белка/мл бронхоальвеолярной жидкости или в нмоль/г ткани.

Определение окислительной модификации белков проводили по методу, описанному Дубининой Е.Е. [3]. Метод основан на реакции взаимодействия карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином. Образование окрашенных 2,4-динитрофенилгидразонов регистрировали спектрофотометрически при 360 нм. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции $22 \cdot 10^3 \text{ моль}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Содержание карбонильных производных выражали в нмоль/мг белка/мл бронхоальвеолярной жидкости.

Определение активности фосфолипазы A_2 Активность фосфолипазы A_2 оценивали методом, предложенным Шарко О.Л. [4] с использованием в качестве хромогенного субстрата 1-ацил-2-[N-(2,4-динитрофенил)-аминопропионил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолина. Образование водорастворимого окрашенного продукта регистрировали при 350 нм. Активность фермента выражали в нмоль/мин/мг белка/мл бронхоальвеолярной жидкости.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов.

Результаты и их обсуждение

На рисунке 1 представлено соотношение основных сурфактантных фракций фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости, которое было в целом типично как для опытных,

так и для контрольных животных. Во всех группах преобладающей фракцией среди фосфолипидов сурфактанта был фосфатидилхолин. Его доля, в среднем, составляла 78%, при этом более 60% было представлено динасыщенной формой, что подтверждает принадлежность выделенных фосфолипидов к сурфактанту легких.

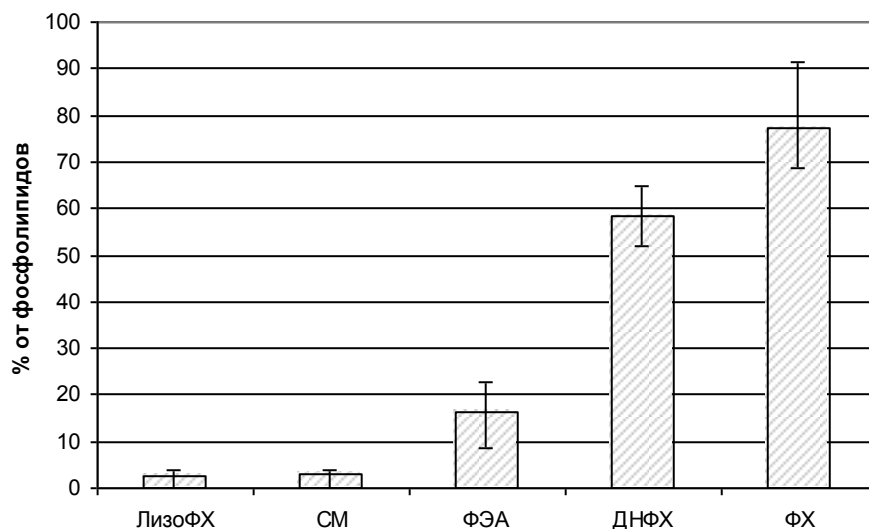


Рисунок 1. Относительное содержание основных фосфолипидных фракций в бронхоальвеолярной жидкости.

Примечание. ЛизоФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭА - фосфатидилэтаноламин, ДНФХ – динасыщенный фосфатидилхолин, ФХ – фосфатидилхолин.

Достоверных изменений в содержании фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости животных, находившихся в условиях гипероксии в течение 3 и 7 суток, не обнаружено (таблица 1). Однако, обращала на себя внимание тенденция к прогрессирующему снижению уровня основных фосфолипидных фракций и общего липидного фосфора.

У животных, находившихся в условиях гипероксии в течение 14 суток, выявлено значительное снижение уровня фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости. Содержание фосфатидилхолина уменьшилось, в среднем, в 3 раза по сравнению с контролем. Другие фракции фосфолипидов либо не определялись вовсе (как лизофосфатидилхолин и сфингомиелин), либо обнаруживались в минимальных количествах (фосфатидилэтаноламин, 7% от контроля). Примечательно, что доля динасыщенного фосфатидилхолина в опытной группе (14 суток) увеличилась и составила 82,6% (77,7; 85,3), что значительно выше, чем в контроле (61,8 (60,8; 63,3), $p < 0,05$). Поскольку этот липид содержит только насыщенные жирные кислоты, он является наиболее устойчивым к окислительному воздействию. Таким образом, такая перестройка в составе фосфолипидов представляется закономерной. Тем не менее, резкое

снижение уровня сурфактантных фосфолипидов может вносить вклад в развитие патологических изменений в легких.

Таблица 1. Влияние гипероксии на содержание основных фосфолипидных фракций сурфактанта в бронхоальвеолярной жидкости

Фосфо- липиды	Длительность воздействия гипероксии					
	3 суток		7 суток		14 суток	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
ЛизоФХ	0,041 (0,033; 0,047)	0,030 (0,021; 0,048)	0,041 (0,032; 0,047)	0,000 (0,000; 0,087)	0,293 (0,040; 0,397)	0,000 (0,000; 0,000)*
СМ	0,038 (0,020; 0,054)	0,000 (0,000; 0,009)	0,039 (0,020; 0,049)	0,000 (0,000; 0,087)	0,312 (0,050; 0,426)	0,000 (0,000; 0,000)*
ФЭА	0,214 (0,135; 0,250)	0,181 (0,123; 0,228)	0,460 (0,354; 0,783)	0,424 (0,398; 0,872)	3,684 (1,964; 4,436)	0,245 (0,195; 0,326)*
ДНФХ	1,250 (0,903; 2,600)	1,200 (1,100; 1,540)	2,010 (1,730; 2,950)	1,245 (0,825; 2,450)	5,720 (4,915; 9,100)	2,500 (1,525; 3,150)*
ФХ сумм.	2,277 (1,695; 3,446)	1,614 (1,592; 2,272)	3,099 (2,467; 4,760)	2,006 (1,416; 3,442)	9,228 (7,776; 14,961)	3,205 (2,115; 3,807)*
ОЛФ	2,491 (1,820; 4,613)	1,614 (1,598; 2,389)	3,733 (3,466; 3,998)	2,236 (1,830; 3,464)	13,228 (12,891; 15,484)	3,342 (2,252; 3,807)*

Примечание. Содержание фосфолипидов (мкмоль фосфора/мг белка/мл бронхоальвеолярной жидкости) представлено в виде: медиана (25 перцентиль; 75 перцентиль). ЛизоФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, ДНФХ – динасыщенный фосфатидилхолин, ФХ сумм. – суммарная фракция фосфатидилхолина, ОЛФ – общий липидный фосфор. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В частности, известно, что изменения со стороны сурфактанта легких играют важную роль в формировании пневмофиброза [5]. Мы полагаем, что нарушения со стороны сурфактантных фосфолипидов в условиях длительной гипероксии могут рассматриваться как один

из патогенетических аспектов бронхолегочной дисплазии, поскольку развитие фиброзных изменений в легких характерно для данной патологии. Обращает на себя внимание и тот факт, что существенные изменения в фосфолипидном составе бронхоальвеолярной жидкости развивались лишь в результате длительного воздействия высоких доз кислорода (14 суток). Исследования, проведенные другими авторами, также не выявили изменений со стороны синтеза и секреции компонентов сурфактанта клетками легких в условиях более кратковременного воздействия гипероксии [2].

Мы предполагали, что снижение уровня фосфатидилхолина в бронхоальвеолярной жидкости может быть связано с усилением его катаболизма в альвеолярном пространстве под действием секреторной фосфолипазы A_2 , которая продуцируется альвеолярными макрофагами. Мы исследовали активность данного фермента у контрольных и опытных животных на 14 сутки гипероксии. Активность фосфолипазы A_2 в опытной группе составила 2,23 (1,81; 2,55) нмоль/мин/мг белка/мл бронхоальвеолярной жидкости, что достоверно ниже, чем в контроле (6,17 (5,65; 8,59) нмоль/мин/мг белка/мл бронхоальвеолярной жидкости, $p < 0,05$). Низкая активность фосфолипазы A_2 соответствовала низкому содержанию лизофосфатидилхолина (продукта, образующегося при распаде фосфатидилхолина под действием данного фермента) (табл.1). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что фосфолипаза A_2 не может являться причиной уменьшения количества фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости при длительной гипероксии.

Другой наиболее вероятной причиной резкого уменьшения содержания фосфолипидов в бронхоальвеолярном пространстве в условиях длительной гипероксии нам представлялось окислительное повреждение компонентов сурфактанта. Для того, чтобы оценить интенсивность процессов перекисного окисления, нами определялось содержание малонового диальдегида и других ТБК-активных продуктов в бронхоальвеолярной жидкости и гомогенате легких. Полученные результаты представлены в таблице 2. Содержание ТБК-активных продуктов в гомогенате легких животных, находившихся в условиях гипероксии, достоверно не изменялось. На 14-е сутки выявлено резкое уменьшение уровня продуктов перекисного окисления липидов в бронхоальвеолярной жидкости; в более короткие сроки инкубации изменений не было обнаружено.

Выраженное снижение уровня продуктов, реагирующих с ТБК, в бронхоальвеолярной жидкости на 14-е сутки гипероксии, на первый взгляд, кажется парадоксальным. Однако, необходимо учитывать и значительное уменьшение общего количества фосфолипидов, которое обнаружено у этой группы животных. При расчете соотношения ТБК-активные продукты/общий липидный фосфор оказалось, что доля продуктов липопероксидации в бронхоальвеолярной жидкости увеличивалась по мере увеличения длительности воздействия высоких

доз кислорода (рисунок 2). На 7-е сутки выявлена отчетливая тенденция к увеличению данного коэффициента, которая, однако, не была статистически достоверна. На 14-е сутки гипероксии коэффициент ТБК-активные продукты/общий липидный фосфор примерно в 1,5 раза превышал аналогичный показатель контрольной группы ($p < 0,05$).

Таблица 2. Влияние гипероксии на содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в бронхоальвеолярной жидкости и гомогенате легких

Содержание ТБК-активных продуктов	Длительность воздействия гипероксии					
	3 суток		7 суток		14 суток	
	Контроль (n=5)	Опыт (n=5)	Контроль (n=5)	Опыт (n=5)	Контроль (n=6)	Опыт (n=5)
в БАЖ, нмоль/мг белка/ мл БАЖ	35,1 (29,4; 35,9)	40,0 (35,9; 40,8)	66,3 (45,5; 74,6)	57,3 (46,7; 66,9)	113,4 (88,6; 165,6)	34,9 (27,0; 52,5)*
В гомогенате легких, нмоль/г ткани	14,2 (9,3; 16,2)	12,5 (8,1; 16,7)	16,8 (14,9; 20,8)	17,3 (12,2; 20,1)	19,2 (11,3; 22,8)	19,1 (16,6; 21,2)

Примечание. Данные являются результатом двух независимых экспериментов и представлены в виде: медиана (25 перцентиль; 75 перцентиль); БАЖ – бронхоальвеолярная жидкость; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

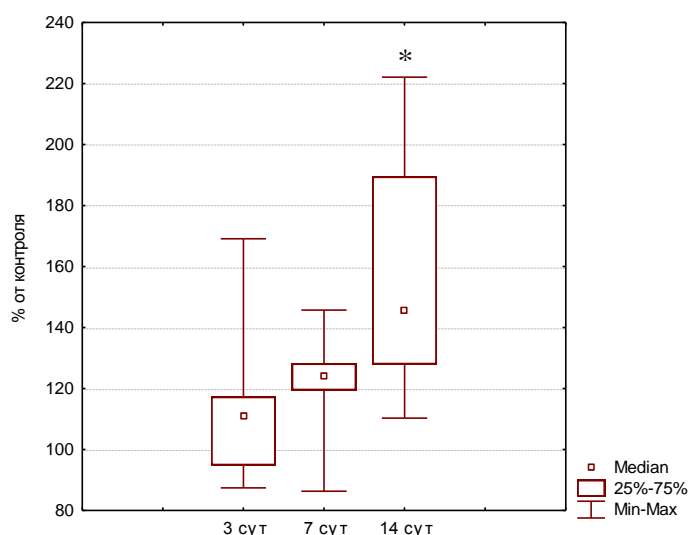


Рисунок 2. Изменение соотношения ТБК-активные продукты/общий липидный фосфор в условиях гипероксии в динамике.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Подобные результаты были получены и при анализе степени окислительной модификации белков. Выявлено достоверное увеличение уровня карбонильных производных аминокислотных остатков в бронхоальвеолярной жидкости животных, находившихся в условиях гипероксии (таблица 3). Причем, в отличие от продуктов перекисного окисления липидов, продукты окислительной модификации белков уже на 3-и сутки обнаруживались в количествах, в 1,5 раза превышающих контрольные значения ($p < 0,05$). При более длительной инкубации (7 суток) описанные изменения сохранялись, а в дальнейшем даже имели тенденцию к умеренному нарастанию (185,5% от контроля на 14-е сутки гипероксии). Достоверных изменений в содержании карбонильных производных в гомогенатах легких обнаружено не было (данные не представлены).

Таблица 3. Влияние гипероксии на содержание общего белка и карбонильных производных в бронхоальвеолярной жидкости

Показатель	Длительность воздействия гипероксии					
	3 суток		7 суток		14 суток	
	Контроль (n=6)	Опыт (n=5)	Контроль (n=6)	Опыт (n=4)	Контроль (n=6)	Опыт (n=5)
Общий белок, мкг/мл БАЖ	850,0 (700,0; 1050,0)	1425,0 (1000,0; 1650,0)*	887,5 (687,5; 1150,0)	824,4 (632,5; 1093,3)	845,8 (728,3; 1007,5)	1177,9 (751,5; 1620,8)
Карбонильные производные, нмоль/мг бел- ка/мл БАЖ	153,3 (140,9; 180,1)	229,9 (185,3; 242,2)*	175,2 (141,2; 190,9)	264,2 (225,9; 272,5)*	150,5 (144,0; 162,2)	279,2 (271,3; 279,2)*

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; БАЖ – бронхоальвеолярная жидкость

Уровень общего белка в бронхоальвеолярной жидкости опытных животных, находившихся в условиях гипероксии в течение 3-х суток, был, в среднем, в 1,7 раз выше, чем в контроле (таблица 3). В других опытных группах содержание белка в альвеолярной жидкости достоверно не изменялось, хотя после воздействия высоких доз кислорода в течение 14 суток имелась тенденция к его увеличению.

Судить о происхождении общего белка в бронхоальвеолярной жидкости можно лишь предположительно, отсюда трудности в интерпретации обнаруженных изменений этого показателя. Чаще всего увеличение уровня белка в альвеолярном пространстве является следствием транссудации белков плазмы крови (альбуминов) и наблюдается при воспалении, а

также при отеке легких [6]. Однако у экспериментальных животных в нашем исследовании не наблюдалось симптомов подобного состояния. В литературе есть сведения об увеличении содержания сурфактант-ассоциированного белка А (SP-A) под влиянием гипероксии [2]. Однако доля этого белка среди других белков бронхоальвеолярной жидкости невелика и составляет в среднем 1-2,5% [7].

Таким образом, совокупность приведенных данных позволяет сделать следующие выводы:

- В условиях длительной гипероксии (14 суток) значительно изменяется количество и состав фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости: содержание фосфатидилхолина уменьшается в 3 раза, другие фосфолипидные фракции практически не определяются, при этом доля динасыщенного фосфатидилхолина увеличивается.
- Воздействие высокой концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе в течение двух недель приводит к снижению активности фосфолипазы А₂ в бронхоальвеолярной жидкости до 36,1% от контрольных значений.
- Содержание общего белка в бронхоальвеолярной жидкости значительно увеличивается при относительно кратковременном воздействии гипероксии (3 суток), а при более длительном воздействии практически не отличается от контроля.
- Доля продуктов перекисного окисления липидов в перерасчете на общее количество фосфолипидов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости в условиях длительной гипероксии (14 суток) значительно увеличена. Это связано, главным образом, со снижением суммарного количества фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости в этот период гипероксии.
- Под влиянием гипероксии усиливается окислительная модификация белков в альвеолярном пространстве, что может служить причиной снижения активности фосфолипазы А₂.

Литература

1. Touqui, L. Interaction of secreted phospholipase A₂ and pulmonary surfactant and its pathophysiological relevance in acute respiratory distress syndrome / L.Touqui, Y.-Z.Wu // *Acta Pharmacol Sin.* – 2003. – Vol. 24, № 12. – P. 1292-1296.
2. Tölle, A. Effect of hyperoxia on the composition of the alveolar surfactant phospholipids, cholesterol, plasmalogens and vitamin E / A. Tölle [et al] // *Biochim. Biophys. Acta – Lipids and Lipid Metab.* – 1997. – Vol. 1346, №2. – P. 198-204.

3. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение / Е.Е. Дубинина // С-Пб, «Медицинская пресса». – 2006. – 400 с.
4. Шарко, О.Л. Синтез 1-О-алкил-2-[N-(2,4-динитрофенил)-β-аминопропионил]-sn-глицеро-3-фосфохолина – хромогенного аналога фактора активации тромбоцитов / О.Л. Шарко, О.В. Князева // Вестник ФФИ. – 2009. - №3. – С. 5-10.
5. Nkadi, P.O. An overview of pulmonary surfactant in the neonate: genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease / P.O. Nkadi, T.A. Merritt, D.-A. M. Pillers // Mol.Genet. Metab. – 2009. – Vol. 97, № 2. – P. 95-101.
6. Reynolds, H. Y. Bronchoalveolar lavage / H. Y. Reynolds // Am. Rev. Respir. Dis. - 1987. - Vol. 135, № 1. - P. 250-263.
7. Günther A. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema / A. Günther [et al] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1996. – Vol.153. – P. 176-184.

Summary

EXPERIMENTAL HYPEROXIA INDUCED ALTERATIONS IN PHOSPHOLIPID AND PROTEIN COMPONENTS OF THE BRONCHOALVEOLAR FLUID

Kotovich I.L., Rutkovskaya J.A., Stovba A.A., Konchits E.S., Taganovich A.D.

Belorussian State Medical University, Minsk, Belarus

High oxygen supplementation during mechanical ventilation is considered to be one of the causative agents of bronchopulmonary dysplasia development in premature infants. Surfactant phospholipids and extracellular proteins may be damaged in the first place under hyperoxic conditions. In the present experimental study prolonged hyperoxia resulted in significant phospholipids decrease, reduction of phospholipase A₂ activity, and increased level of lipid and protein oxidation products in the bronchoalveolar fluid.

Key words: hyperoxia, bronchoalveolar fluid, phospholipids, proteins.