

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

КОРРЕКЦИЯ ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА В ЛЁГКИХ ПРИ ГИПЕРОКСИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПОСОМНЫХ ФОРМ АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛА И РЕТИНОИДОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

И.Л. Котович, Ж.А. Рутковская, А.Д. Таганович*

Белорусский государственный медицинский университет,
Республика Беларусь, 220116, Минск, пр-т Дзержинского, 83; эл. почта: kotovich-iryna@rambler.ru

Изучено влияние ингаляционного введения липосом, содержащих дипальмитоилфосфатидилхолин и α -токоферол, а также липосом, содержащих дипальмитоилфосфатидилхолин, ретинол и ретиновую кислоту, на показатели системы оксиданты-антиоксиданты в лёгких новорожденных морских свинок, подвергавшихся гипероксии в течение 3 и 14 суток. Установлено, что введение обоих видов липосом на фоне длительной гипероксии (14 суток) нормализует активность глутатиопероксидазы и предотвращает рост уровня продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в бронхоальвеолярной лаважной жидкости. В отличие от липосом с α -токоферолом, введение липосом, содержащих ретиноиды, не оказывало нормализующего влияния на содержание небелковых SH-соединений в бронхоальвеолярной жидкости и способствовало выраженному снижению уровня α -токоферола в тканях лёгких.

Ключевые слова: гипероксия, лёгкие, липосомы, ретиноиды, α -токоферол

DOI: 10.18097/PBMC20176304289

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к проблеме влияния на организм гипероксии обусловлен, главным образом, использованием кислорода в терапевтических целях. Токсическое действие кислорода является одним из факторов, способствующих повреждению лёгких и развитию бронхолёгочной дисплазии у новорожденных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении [1]. Незрелость альвеолярного отдела лёгких у таких детей требует использования повышенной концентрации кислорода во вдыхаемой смеси для обеспечения эффективного газообмена. Для борьбы с окислителями в зрелых лёгких присутствует мощная система антиоксидантной защиты. Причем ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы присутствуют в лёгких как внутриклеточно, так и в жидкости, выстилающей альвеолярный эпителий. Это является необходимым условием для обеспечения защиты не только клеток, но и внеклеточных молекулярных структур, в частности, сурфактанта, от повреждения.

Известно, что у недоношенных детей имеет место дефицит антиоксидантов, который усугубляет ситуацию и провоцирует более тяжелое течение оксидативного стресса даже при незначительном окислительном воздействии [2]. Восполнение дефицита антиоксидантов в лёгких представляется перспективным направлением для исследований, преследующих цель разработки способов предотвращения повреждения лёгких в условиях гипероксии и профилактики бронхолёгочной дисплазии. Особого внимания заслуживают природные формы антиоксидантов, являющиеся нетоксичными и в норме выполняющие важные функции в лёгких.

α -Токоферол включается альвеолоцитами 2-го типа в состав легочного сурфактанта и является важным фактором защиты его ненасыщенных липидных фракций от повреждения оксидантами [3]. Кроме того, он проявляет иммуномодулирующие эффекты, молекулярный механизм которых в настоящее время изучается. Ретиноиды, помимо антиоксидантного действия, играют важную роль в процессах роста и созревания лёгких плода, способствуют образованию межальвеолярных перегородок и увеличению числа альвеол [4].

Для эффективной коррекции повреждений лёгких важно обеспечить целенаправленную доставку препаратов к клеткам и тканям. Ингаляционный путь введения отвечает этому требованию, однако сопряжен с определёнными трудностями при использовании жирорастворимых соединений из-за высокой вязкости препаратов и невозможности использования *in vivo* токсичных неполярных растворителей. В связи с этим особого внимания заслуживает липосомная форма препаратов, которая, по данным исследований, хорошо проникает в лёгкие и обеспечивает локально высокую концентрацию вводимого вещества [5].

Цель данного исследования – изучить влияние липосом, содержащих α -токоферол и ретиноиды, на состояние антиоксидантной системы и содержание продуктов окислительной модификации липидов и белков в лёгких новорожденных морских свинок, подвергавшихся гипероксии.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на новорожденных морских свинок с соблюдением этических норм и правил проведения работ с лабораторными

* - адресат для переписки

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 70% (температура 20-25°C, относительная влажность 50-80%). Концентрацию кислорода в камере контролировали с помощью анализатора кислорода ПГК-06-100Р (ЗАО “Инсовт”, РФ). Длительность инкубации в условиях гипероксии составляла 3 и 14 суток (именно в эти сроки, как было установлено нами ранее, наблюдаются наиболее выраженные изменения в лёгких [6]). Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. Каждая группа включала 4-5 животных. Для каждого из изучаемых сроков воздействия было проведено не менее двух независимых экспериментов, результаты которых суммированы в приводимых данных.

Приготовление и состав липосом

В качестве основного липидного компонента липосом использовали L- α -дипальмитоил-фосфатидилхолин (ДПФХ, “Sigma”, США). ДПФХ входит в состав сурфактанта лёгких и представляет собой фракцию наименее подверженную окислению, поскольку содержит только насыщенные жирные кислоты. В экспериментах использовали мультимеллярные липосомы, приготовленные методом механического диспергирования [7]: к сухой плёнке, полученной после упаривания липидной смеси при 38°C на вакуумном ротационном испарителе, добавляли буферный раствор и встряхивали на миксере Maxi-Mix 1 (“Thermolyne”, США) до образования однородной суспензии.

В группе “гипероксия + токоферол_{лип.}” для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь мультимеллярных липосом, содержащих α -токоферол (12,5 мг/кг), ДПФХ (45 мг/кг) и 0,1 М натрий-фосфатный буфер, содержащий 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,4.

В группе “гипероксия + ретиноиды_{лип.}” для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь мультимеллярных липосом, содержащих ретинол (6 мг/кг), ретиноевую кислоту (0,6 мг/кг), ДПФХ (45 мг/кг) и 0,1 М натрий-фосфатный буфер, содержащий 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,4. Комбинация *полностью транс*-ретинола и *полностью транс*-ретиноевой кислоты, по данным литературы, обеспечивает более эффективное поступление ретиноидов в ткани [8]. Есть данные о наличии эффекта синергизма этих двух форм витамина А по уменьшению повреждающего воздействия гипероксии на лёгкие [9].

Для ингаляционного введения липосом использовали компрессорный небулайзер Comp Air (NE-C28-E, “Omron”, Китай). Ингаляции проводили 1 раз в два дня, всего дважды в течение 3 суток и 7 раз в течение 14 суток воздействия гипероксии.

По окончании эксперимента животных наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг внутривенно) и получали материал для исследования не ранее, чем через 22 ч после

последнего введения препарата. В качестве материала для исследования использовали бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ) и гомогенаты лёгких. БАЛЖ получали путём промывания лёгких через эндотрахеальный зонд 0,9% раствором NaCl, центрифугировали 10 мин при 200 g, 4°C (рефрижераторная центрифуга PC-6, Кыргызстан) для осаждения клеток. Для получения тканевого гомогената лёгкие после удаления крупных бронхов взвешивали на аналитических весах, тщательно измельчали ножницами, после чего растирали в стеклянном гомогенизаторе во льду, добавляя физиологический раствор (2,0 мл на г ткани), до образования однородного гомогената.

Общий белок определяли по методу Lowry [10].

Активность СОД определяли в БАЛЖ непрямым спектрофотометрическим методом с использованием аналитических наборов (“Анализ X”, РБ). Метод основан на ингибировании супероксидзависимого окисления кверцетина в присутствии СОД. Активность фермента выражали в нмоль/мин/мг белка.

Активность каталазы в БАЛЖ определяли спектрофотометрическим методом [11], в основе которого лежит способность пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стабильный окрашенный комплекс, который регистрируется при 410 нм. Активность фермента выражали в нмоль/мин/мг белка.

Активность глутатионпероксидазы (ГП) в БАЛЖ определяли по методу Моина [12]. Скорость глутатионпероксидазной реакции оценивали по количеству непрореагировавшего восстановленного глутатиона, который определяли реакцией с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. Количество образующегося при этом окрашенного продукта измеряли спектрофотометрически при 412 нм. Активность ГП выражали в нмоль/мин на мг белка.

Определение содержания восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений проводили после осаждения белков БАЛЖ. Метод основан на реакции взаимодействия SH-групп глутатиона с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой с образованием 2-нитро-5-меркаптобензойной кислоты, способной поглощать свет при длине волны 412 нм. Содержание восстановленного глутатиона выражали в нмоль/мг белка.

Содержание альфа-токоферола и ретинола определяли с использованием флуориметрического метода [13]. Поскольку концентрация ретинола и α -токоферола в БАЛЖ новорожденных морских свинок была ниже порога чувствительности метода, определение проводили в гомогенатах лёгких животных, содержание выражали в нмоль/мг белка.

Для оценки интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в БАЛЖ определяли содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов (ДК), продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-ПП) и оснований Шиффа (ОШ)).

Для определения содержания ДК и ОШ использовали метод, основанный на экстракции

этих соединений смесью равных объёмов гептана и изопропанола [14]. Для исследования использовали изопропанольную фазу, в которую экстрагируются продукты перекисидации фосфолипидов. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ("Solar", РБ) против соответствующего контроля при 220 нм (соединения с изолированными двойными связями), 232 нм (ДК), 400 нм (ОШ). О количественных изменениях продуктов ПОЛ судили по величине отношения оптической плотности (Е): E232/E220 (для ДК), E400/E220 (для ОШ). Результат пересчитывали на мкмоль общего липидного фосфора и выражали в единицах индекса окисления (е.и.о.) [14].

Метод определения ТБК-РП основан на взаимодействии малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием триметинового комплекса розового цвета [15]. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически при 532 нм. Содержание пересчитывали на мкмоль общего липидного фосфора в пробе и выражали в отн.ед.

Определение окислительной модификации белков проводили по методу, описанному Дубининой [16], который 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 расчёта использовали коэффициент молярной экстинкции $22 \cdot 10^3$ моль⁻¹см⁻¹. Содержание карбонильных производных в БАЛЖ выражали в нмоль/мг белка.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10,0. Для анализа данных опытных и контрольных групп на первом этапе определяли нормальность распределения цифровых показателей с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Дальнейший статистический анализ проводили с использованием непараметрического U-теста Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (25 перцентиль – 75 перцентиль).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были получены данные об изменении активности окислительных процессов и содержания антиоксидантов в лёгких новорожденных морских свинок в динамике гипероксии [6]. В частности, было обнаружено, что воздействие гипероксии в течение 3-х суток приводило к снижению активности ГП в БАЛЖ опытных животных до 43% от уровня контрольных значений ($p < 0,05$, табл. 1) и уменьшению содержания α -токоферола в гомогенате лёгких до 56% от уровня контроля ($p < 0,05$). На этом фоне отмечалось достоверное увеличение уровня первичных продуктов ПОЛ (ДК) и карбонильных производных аминокислот в белках (в 2,8 и 4,5 раза соответственно, табл. 1).

Введение липосом, содержащих α -токоферол, на фоне непродолжительной гипероксии (3 суток) не оказывало существенного влияния на содержание

Таблица 1. Влияние липосом с α -токоферолом и ретиноидами на содержание антиоксидантов и продуктов окислительной модификации липидов и белков в лёгких новорожденных морских свинок при действии гипероксии в течение 3-х суток

Показатель \ Группа	Контроль	Гипероксия 3 суток	Гипероксия 3 суток + α -токоферол _{лип.}	Гипероксия 3 суток + ретиноиды _{лип.}
Общий белок в БАЛЖ, мг/л	280,0 (235,4 – 341,6)	264,6 (202,5 – 329,1)	325,8 (196,7 – 365,0)	174,2 (150,8 – 276,6)
Небелковые SH-соединения в БАЛЖ, нмоль/мг белка	61,2 (40,4 – 89,3)	84,4 (63,7 – 112,4)	69,3 (39,8 – 93,7)	76,3 (58,4 – 106,9)
Глутатионпероксидаза в БАЛЖ, нмоль/мин/мг белка	86,5 (62,8 – 99,0)	37,2 (12,1 – 65,5)*	73,8 (66,4 – 96,2)^	50,3 (36,7 – 126,3)
СОД в БАЛЖ, нмоль/мин/мг белка	44,4 (42,6 – 57,4)	47,1 (37,5 – 61,3)	42,6 (34,9 – 52,6)	45,0 (35,3 – 51,8)
Каталаза в БАЛЖ, нмоль/мин/мг белка	0,28 (0,21 – 0,46)	0,35 (0,27 – 0,42)	0,37 (0,26 – 0,45)	0,32 (0,30 – 0,32)
Токоферол в лёгких, нмоль/мг белка	0,63 (0,46 – 0,88)	0,35 (0,28 – 0,38)*	0,49 (0,21 – 0,54)	0,40 (0,35 – 0,47)*
Ретинол в лёгких, нмоль/мг белка	0,18 (0,14 – 0,24)	0,16 (0,14 – 0,19)	0,14 (0,11 – 0,19)	0,11 (0,10 – 0,13)*
ДК, е.и.о.	1,32 (1,00 – 1,38)	3,69 (2,21 – 4,37)*	2,50 (2,08 – 4,50)*	2,27 (1,85 – 3,07)*
ТБК-РП, отн.ед.	8,93 (8,16 – 15,3)	12,27 (10,37 – 20,37)	4,32 (4,27 – 13,45)	10,67 (3,34 – 18,21)
ОШ, е.и.о.	0,29 (0,24 – 0,30)	0,36 (0,27 – 0,92)	0,24 (0,18 – 0,35)	0,12 (0,09 – 0,14)*^
Карбонильные производные, нмоль/мг белка	13,18 (10,69 – 37,62)	60,09 (26,04 – 73,57)*	51,11 (26,01 – 58,81)*	33,31 (24,22 – 63,00)

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^ - $p < 0,05$ по сравнению с группой "гипероксия 3 суток".

КОРРЕКЦИЯ ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА В ЛЁГКИХ

общего белка в БАЛЖ (табл. 1). В эти сроки не было выявлено влияния токоферола на содержание восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений в БАЛЖ, однако активность ГП увеличивалась практически в 2 раза ($p < 0,05$) и находилась в пределах контрольных значений. Содержание токоферола в лёгких новорожденных морских свинок, у которых использовали данный способ коррекции, достоверно не отличалось от группы “гипероксия 3 суток”. Мы не выявили существенного эффекта от введения липосом, содержащих α -токоферол, в отношении уровней ДК и карбонильных производных (они оставались повышенными, как и в группе “гипероксия 3 суток”), а также в отношении других изучаемых показателей при действии гипероксии в течение 3-х суток.

Введение липосом, содержащих ретиноиды, на фоне непродолжительной гипероксии (3 суток) не оказывало существенного влияния на содержание общего белка, небелковых SH-соединений и активность антиоксидантных ферментов в лёгких. Содержание α -токоферола оставалось сниженным, а количество ДК было выше, чем в контроле (как и в группе “гипероксия 3 суток”). Сохранялась тенденция к увеличению уровня карбонильных производных в белках, но отмечалось уменьшение содержания ОШ в БАЛЖ. Уровень ретинола в гомогенатах лёгких был на 31% ниже, чем у животных контрольной группы (табл. 1).

Увеличение продолжительности гипероксии до 14 суток сопровождалось более выраженными изменениями оксидантно-антиоксидантного баланса в лёгких (табл. 2).

Таблица 2. Влияние липосом с α -токоферолом и ретиноидами на содержание антиоксидантов и продуктов окислительной модификации липидов и белков в лёгких новорожденных морских свинок при действии гипероксии в течение 14 суток

Показатель \ Группа	Контроль	Гипероксия 14 суток	Гипероксия 14 суток + α -токоферол _{лип.}	Гипероксия 14 суток + ретиноиды _{лип.}
Общий белок в БАЛЖ, мг/л	164,2 (113,3 – 192,5)	314,8 (262,1 – 383,7)*	441,2 (378,5 – 507,0)*	308,5 (296,3 – 384,5)*
Небелковые SH-соединения в БАЛЖ, нмоль/мг белка	111,7 (60,2 – 178,6)	75,8 (36,7 – 121,3)*	117,9 (113,0 – 125,6)^	78,1 (73,6 – 102,7)
Глутатионпероксидаза в БАЛЖ, нмоль/мин/мг белка	49,5 (29,5 – 62,1)	15,2 (0 – 20,2)*	68,1 (52,5 – 78,1)^	55,0 (45,9 – 70,2)^
СОД в БАЛЖ, нмоль/мин/мг белка	44,2 (38,7 – 52,9)	42,8 (35,5 – 57,1)	37,6 (27,9 – 38,4)	44,4 (40,5 – 53,1)
Каталаза в БАЛЖ, нмоль/мин/мг белка	0,26 (0,19 – 0,32)	0,19 (0,16 – 0,25)	0,26 (0,25 – 0,26)	0,25 (0,21 – 0,27)
Токоферол в лёгких, нмоль/мг белка	0,46 (0,38 – 0,61)	0,33 (0,29 – 0,50)*	0,45 (0,41 – 0,53)	0,20 (0,17 – 0,25)*^
Ретинол в лёгких, нмоль/мг белка	0,38 (0,33 – 0,43)	0,33 (0,22 – 0,41)	0,36 (0,33 – 0,39)	0,29 (0,22 – 0,31)*
ДК в БАЛЖ, е.и.о.	2,18 (1,45 – 2,42)	3,66 (2,06 – 4,30)*	2,52 (2,19 – 2,89)	0,97 (0,95 – 1,19)*^
ТБК-РП в БАЛЖ, отн.ед.	4,52 (3,75 – 7,39)	8,67 (5,25 – 18,45)*	4,05 (3,18 – 4,44)^	3,97 (3,28 – 6,72)^
ОШ в БАЛЖ, е.и.о.	0	0,75 (0,63 – 0,90)*	0,44 (0,23 – 0,65)*^	0,03 (0,02 – 0,04)^
Карбонильные производные в БАЛЖ, нмоль/мг белка	24,23 (20,58 – 25,95)	33,09 (14,39 – 46,25)	15,53 (13,09 – 20,28)*^	12,38 (10,87 – 15,65)*^

Примечание - * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^ - $p < 0,05$ по сравнению с группой “гипероксия 14 суток”.

Активность ГП в группе “гипероксия 14 суток” уменьшилась до 31% от контроля, уровень α -токоферола в гомогенате лёгких оставался сниженным (72% от контроля, $p < 0,05$). Кроме того, отмечалось падение уровня восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений в БАЛЖ: он составил 75,8 (36,7 – 121,3) нмоль/мг белка ($p < 0,05$ по сравнению с 111,7 (60,2 – 178,6) нмоль/мг белка в контрольной группе. В БАЛЖ выявлено увеличенное по сравнению с контролем содержание ДК (в 1,7 раза); ТБК-РП (в 1,9 раза); ОШ (0,75 е.и.о. в группе “гипероксия 14 суток”, тогда как в группе “контроль” ОШ не определялись). В группе “гипероксия 14 суток” сохранялась тенденция к росту уровня карбонильных производных в белках БАЛЖ, однако данная тенденция не была статистически достоверной. Концентрация общего белка в БАЛЖ в группе животных, подвергавшихся гипероксии в течение 14 суток, была значительно выше, чем в контроле (в 1,9 раза, $p < 0,05$). Активность СОД и каталазы в БАЛЖ, а также содержание ретинола в гомогенатах лёгких под влиянием гипероксии достоверно не изменялись.

При введении липосом с α -токоферолом на фоне длительной гипероксии (14 суток) уровень общего белка в БАЛЖ животных был повышен: медиана составила 441,2 мг/л, что в 1,4 раза выше, чем в соответствующей группе “гипероксия”, и в 2,7 раза выше по отношению к контролю ($p < 0,05$) (табл. 2). Введение липосом с токоферолом в лёгкие животным на фоне длительной (14 суток) гипероксии сопровождалось ростом в 1,5 раза и нормализацией содержания восстановленного глутатиона в БАЛЖ

($p < 0,05$ по сравнению с группой “гипероксия 14 суток”, $p > 0,8$ по сравнению с группой “контроль”). Активность ГП в БАЛЖ также значительно увеличивалась, практически до контрольного уровня, и составляла 68,1 (62,5 – 78,1) нмоль/мин/мг белка. В группе без коррекции она была 15,2 (0 – 20,2) нмоль/мин/мг белка. После введения липосом, содержащих витамин Е, содержание альфа-токоферола в лёгких опытных животных, подвергавшихся гипероксии, увеличивалось в 1,4 раза ($p < 0,05$) и соответствовало контрольным значениям.

На фоне введения липосом, содержащих α -токоферол, у животных, находившихся в условиях высокой концентрации кислорода, количество ТБК-РП, ОШ и карбонильных производных белков в БАЛЖ по сравнению с опытной группой “гипероксия” значительно уменьшилось (1,7 – 2,1 раза, для всех $p < 0,05$). Уровень ДК в БАЛЖ также имел тенденцию к снижению (разница по сравнению с группой “гипероксия 14 суток” статистически недостоверна).

При введении липосом, содержащих ретинол и ретиноевую кислоту, на фоне длительной гипероксии (14 суток) уровень общего белка в БАЛЖ животных был повышен по отношению к контролю и составил 308,5 (296,3 – 384,5) мг/л ($p < 0,05$), что достоверно не отличалось от соответствующей группы “гипероксия” (табл. 2). При введении животным липосом с ретиноидами в условиях долгосрочной гипероксии активность ГП в БАЛЖ увеличивалась в 3,6 раза ($p < 0,05$), а уровень токоферола в лёгких снижался до 0,20 (0,17 – 0,25) нмоль/мг белка, что ниже, чем в контроле в 2,3 раза ($p < 0,05$), и ниже, чем в соответствующей группе гипероксии в 1,7 раза ($p < 0,05$). Содержание самого ретинола в лёгких при этом достоверно не отличалось от группы “гипероксия 14 суток”, но было статистически значимо ниже, чем в группе контроля (в 1,3 раза, $p < 0,05$).

У животных, которые находились в условиях гипероксии 14 суток и получали ингаляции с ретиноидами в составе липосом, отмечалось значительное уменьшение уровня продуктов ПОЛ (ДК, ТБК-РП и ОШ) и карбонильных производных белков в БАЛЖ. Достоверные различия в содержании ТБК-РП, и ОШ у животных контрольной группы и группы “гипероксия + ретиноиды_{лип.}” отсутствовали. Уровень ДК и карбонильных производных становился даже ниже, чем в контроле ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вдыхание смеси с высоким содержанием кислорода в воздухе в течение 3 суток индуцирует процессы ПОЛ и окислительной модификации белков в лёгких, что подтверждается ростом уровня первичных продуктов ПОЛ (ДК) и карбонильных производных в белках БАЛЖ. Увеличение продолжительности гипероксии до 14 суток приводило к накоплению в БАЛЖ не только первичных, но вторичных и конечных продуктов ПОЛ (ТБК-РП и ОШ). Сохранялась тенденция к росту уровня карбонильных производных в белках. Данные изменения развивались на фоне снижения активности ферментативных и неферментативных антиоксидантов в лёгких.

Спустя 3 суток воздействия гипероксии концентрация SH-соединений в БАЛЖ достоверно не отличалась от контроля и даже имела тенденцию к росту, что можно рассматривать как компенсаторную защитную реакцию. Подобное увеличение количества восстановленного глутатиона в БАЛЖ отмечалось и ранее в ответ на повреждение окислителями (сигаретный дым) [17]. При увеличении продолжительности гипероксии содержание небелковых SH-соединений в БАЛЖ новорожденных морских свинок снижалось и составляло 68% от контроля на 14-е сутки.

По нашим данным, даже непродолжительная гипероксия (3 суток) приводит к уменьшению уровня основного жирорастворимого антиоксиданта в лёгких (α -токоферола) и снижению активности ГП во внеклеточном пространстве. Интересно, что по данным других исследователей, влияние активных форм кислорода и гипероксии *in vitro* вызывает индукцию синтеза антиоксидантных ферментов, в частности, СОД и ГП, на уровне транскрипции за счёт активации транскрипционных факторов NF- κ B и белка-активатора 1 (Activator Protein 1; AP-1) [18, 19]. Хотя мы не исключаем усиления экспрессии данных белков *in vivo*, однако, как следует из приведенных нами данных, это не сопровождается ростом активности ГП и СОД в БАЛЖ. Подобное несоответствие уровня экспрессии белка его активности в тканях уже было ранее описано в отношении СОД [20]. По нашему мнению, индукцией синтеза СОД можно объяснить поддержание активности этого фермента на уровне контрольных значений у животных, находившихся под влиянием гипероксии. Падение активности ГП может быть обусловлено как повреждением фермента вследствие окислительной модификации (в частности, окисления селена в активном центре), так и усиления его протеолитического расщепления [16]. Выраженное снижение активности ГП является крайне неблагоприятным, поскольку данный фермент способен обезвреживать не только активные формы кислорода, но и органические гидроперекиси, включая перекиси ненасыщенных жирных кислот [16].

Введение липосом, содержащих как α -токоферол, так и ретиноиды, на фоне непродолжительной гипероксии (3 суток) не сопровождалось нормализацией уровня ДК в БАЛЖ. В условиях длительной гипероксии (14 суток) ингаляционное введение липосом в целом оправдало себя в плане коррекции оксидантно-антиоксидантного статуса лёгких. У новорожденных морских свинок, которые получали ингаляции с липосомами, содержащими α -токоферол, на фоне длительной гипероксии, увеличивалось содержание антиоксидантов в лёгких (токоферола, восстановленного глутатиона, ГП). Известно, что витамин Е оказывает стимулирующее действие на синтез глутатиона за счёт индукции γ -глутамил-цистеинсинтазы [21]. Кроме того, было установлено, что скорость окисления в клетках SH-соединений находится в зависимости от обеспеченности различных компартментов токоферолом [22]. Эти сведения позволяют прийти

к заключению о том, что повышение уровня токоферола в лёгких закономерно привело к повышению концентрации SH-групп. Эффект увеличения активности ГП после добавления токоферола был описан ранее на культуре кардиомиоцитов [23]. По данным этих авторов, он не был обусловлен влиянием на экспрессию соответствующего гена, что свидетельствовало о наличии некоего посттранскрипционного регуляторного механизма. На фоне роста активности антиоксидантов снижалось содержание продуктов ПОЛ и карбонильных производных белков в БАЛЖ.

Полученные результаты также свидетельствуют об уменьшении признаков окислительного повреждения липидных и белковых компонентов в БАЛЖ новорожденных морских свинок в условиях длительной гипероксии в результате ингаляционного введения липосом, содержащих ретиноиды. Мы обнаружили уменьшение уровня продуктов ПОЛ и карбонильных производных белков в БАЛЖ, которому сопутствовало повышение активности ферментного антиоксиданта ГП. Однако содержание SH-соединений оставалось сниженным и не отличалось от группы “гипероксия 14 суток”.

Одним из механизмов, способствующих подавлению окислительного стресса в лёгких при введении ретиноидов, может служить способность ретиноевой кислоты подавлять продукцию супероксидного анион-радикала и пероксида водорода. Данная способность была ранее продемонстрирована *in vitro* на клетках, выделенных из крови (нейтрофилах и макрофагах) [24]. Антиоксидантное действие ретиноидов в значительной степени обусловлено также их влиянием на генетическом уровне на синтез ферментов. Имеются данные о том, что в миобластах ретиноиды являются индукторами синтеза секреторной формы глутатионпероксидазы – глутатионпероксидазы 3 [25]. Сами по себе ретиноиды не являются типичными антиоксидантами, однако, благодаря наличию системы сопряженных двойных связей могут взаимодействовать со свободными радикалами и уменьшать их количество. При таком взаимодействии образуются продукты ПОЛ, которые, в свою очередь, требуют обезвреживания. В нашем исследовании на фоне ингаляционного введения ретиноидов в лёгких значительно уменьшалось содержание токоферола. Мы предполагаем, что это может быть обусловлено увеличением потребности в антиоксидантах для предотвращения окисления и/или обезвреживания продуктов окисления ретинола.

Применение ретиноидов на фоне гипероксии не приводило к накоплению ретинола в ткани лёгких животных. Напротив, содержание ретинола в обеих экспериментальных группах (“гипероксия 3 суток + ретиноиды” и “гипероксия 14 суток + ретиноиды”) становилось ниже, чем в соответствующих группах контроля. Подобное явление отмечалось только у животных, подвергавшихся гипероксии. При ингаляционном введении липосом с ретиноидами контрольным животным мы отмечали увеличение содержания ретинола в лёгких до 0,25 (0,23 – 0,28)

нмоль/мг белка на 3-и сутки и до 0,67 (0,50 – 0,77) нмоль/мг белка на 14-е сутки (для обоих сроков разница с группами контроля статистически достоверна). Можно предположить, что в условиях гипероксии в лёгких усилена утилизация витамина А, в частности, для нейтрализации образующихся активных форм кислорода. Основанием для такого предположения являются результаты экспериментального исследования, в ходе которого введение комбинации ретинола с ретиноевой кислотой крысам в условиях умеренного воспаления усиливало экспрессию в лёгких белков STRA6 и CYP26B1, опосредующих поступление ретинола в клетки и последующий его метаболизм [26]. Заслуживает внимания то обстоятельство, что в вышеуказанных условиях не отмечалось столь значительного роста экспрессии белка LRAT, ответственного за депонирование ретинола в ткани, как это наблюдалось у интактных животных.

Следует отметить, что, несмотря на благоприятные изменения со стороны оксидантно-антиоксидантного равновесия, после введения обоих видов липосом уровень общего белка в БАЛЖ оставался повышенным. Подобное изменение состава БАЛЖ, как правило, связывают с усилением трансудации белков плазмы крови и расценивают как проявление воспаления [27]. Вероятно, воспалительная реакция в лёгких, вызванная гипероксией, не исчезает и после введения липосом с токоферолом и ретиноидами.

Совокупность полученных результатов позволяет заключить:

1. Воздействие гипероксии в течение 3 суток приводит к ослаблению систем антиоксидантной защиты и активации оксидативных процессов в лёгких новорожденных морских свинок. Спустя 14 суток гипероксии сдвиг оксидантно-антиоксидантного равновесия становится более выраженным.

2. Ингаляционное введение липосом, содержащих ДПФХ и α -токоферол, способствует повышению активности ГП у животных, подвергавшихся гипероксии в течение 3 суток, до уровня контрольных значений, но не сопровождается уменьшением содержания ДК в БАЛЖ. Введение липосом на фоне длительной гипероксии (14 суток) предотвращает развитие оксидантно-антиоксидантного дисбаланса в лёгких новорожденных морских свинок.

3. Ингаляционное введение липосом, содержащих ДПФХ, ретинол и ретиноевую кислоту, у животных, подвергавшихся гипероксии в течение 14 суток, не корректирует сниженное количество небелковых SH-соединений и α -токоферола в лёгких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овсянников Д.Ю., Петрук Н.И., Кузьменко Л.Г. (2004) Педиатрия, №1, 3-8.
2. Hayes D. Jr., Feola D.J., Murphy B.S., Shook L.A., Ballard H.O. (2010) Respiration, **79**, 425-436.
3. Kolleck I., Sinha P., Rustow B. (2002) Am. J. Respir. Crit. Care Med., **166**, S62-S66.

4. Guimaraes H., Guedes M.B., Rocha G., Tome T., Albino-Teixeira A. (2012) *Curr. Pharm. Des.*, **18**(21), 3101-3113.
5. Suntres Z.E. (2011) *Toxicol.*, 2011, 152474. DOI: 10.1155/2011/152474.
6. Рутковская Ж.А., Котович И.Л., Таганович А.Д. (2012) *Медиц. журнал*, №2, 97-102.
7. Dua J.S., Rana A.C., Bhandari A.K. (2012) *Int. J. Pharm. Studies Res.*, **3**, 14-20.
8. Ross A.C., Ambavalanan N., Zolfaghari R., Li N. (2006) *J. Lipid Res.*, **47**, 1844-1851.
9. James M.L., Ross A.C., Bulger A., Philips J.B. III, Ambalavanan N. (2010) *Pediatr. Res.*, **67**(6), 591-597.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
11. Мамонтова Н.С., Белобородова Э.И., Тюкалова Л.И. (1994) *Клин. лаб. диагн.*, №1, 27-28.
12. Моин В.М. (1986) *Лаб. дело*, №12, 724-727.
13. Taylor S.L., Lamden M.P., Tappel A.L. (1976) *Lipids*, **11**(7), 530-538.
14. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. (1989) *Вопр. мед. химии*, **35**(1), 127-135.
15. Гончаренко М.С., Латинова А.М. (1985) *Лаб. дело*, №1, 60-61.
16. Дубинина Е.Е. (2006) *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение*, "Медицинская пресса", С-Пб, 400 с.
17. Neurohr C., Lenz A.-G., Ding I., Leuchte H., Kolbe T., Behr J. (2003) *Eur. Respir. J.*, **22**, 82-87.
18. Kinnula V.L., Crapo J.D. (2003) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **167**, 1600-1619.
19. Comhair S.A.A., Thomassen M.J., Erzurum S.C. (2000) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **23**, 350-354.
20. Mamo L.B., Suliman H.B., Giles B.-L., Auten R.L., Piantadosi C.A., Nozik-Grayck E. (2004) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **170**, 313-318.
21. Rimbach G., Moehring J., Huebbe P., Lodge J.K. (2010) *Molecules*, **15**(3), 1746-1761.
22. Vatassery G.T., Smith W.E., Quach H.T., Lai J.C. (1995) *Neurochem. Int.*, **26**(5), 527-535.
23. Li R.K., Cowan D.B., Mickle D.A., Weisel R.D., Burton G.W. (1996) *Free Radic. Biol. Med.*, **21**(4), 419-426.
24. Wolfson M., Shinywell E.S., Zvillich M., Rager-Zisman B. (1988) *Clin. Exp. Immunol.*, **72**, 505-509.
25. Haddad M.E., Jean E., Turki A., Hugon G., Vernus B., Bonnieu A., Passerieux E., Hamade A., Mercier J., Laoudi-Chenivresse D., Carnac G. (2012) *J. Cell Science*, **125**, 6147-6156.
26. Wu L., Ross A.C. (2013) *Br. J. Nutr.*, **109**(10), 1739-1745.
27. Reynolds H.Y. (1987) *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**(1), 250-263.

Поступила: 11. 04. 2017.
Принята к печати: 05. 08. 2017.

CORRECTION OF THE OXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN LUNGS DURING HYPEROXIA BY LIPOSOMAL ALPHA-TOCOPHEROL AND RETINOIDS IN THE EXPERIMENT

I.L. Kotovich, Zh.A. Rutkovskaya, A.D. Tahanovich

Belarusian State Medical University,
83 Dzersinski av., Minsk, 220116 Republic of Belarus; e-mail: kotovich-iryna@rambler.ru

The influence of inhaled liposomes, containing dipalmitoyl phosphatidylcholine and α -tocopherol, and liposomes containing dipalmitoyl phosphatidylcholine, retinol and retinoic acid, on parameters of the oxidant-antioxidant system in lungs of newborn guinea pigs exposed to hyperoxia during 3 and 14 days has been studied. Administration of both types of liposomes under conditions of prolonged hyperoxia (14 days) results in normalization of glutathione peroxidase activity and prevents elevation of the levels of lipid and protein peroxidation products in bronchoalveolar lavage fluid. Unlike liposomes with α -tocopherol, administration of liposomes containing retinoids did not cause the normalizing effect on the content of nonprotein SH-compounds in the bronchoalveolar fluid and contributed to significant reduction of the α -tocopherol level in lung tissues.

Key words: hyperoxia, lungs, liposomes, retinoids, α -tocopherol