

## ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЛЕГКИХ ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ ЛИПОСОМ НА ОСНОВЕ ЯИЧНОГО ЛЕЦИТИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИИ

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

УО «Белорусский государственный медицинский университет»  
220116, Республика Беларусь, Минск, просп. Дзержинского, д. 83

Окислительный стресс рассматривают как один из факторов, приводящих к повреждению легких у недоношенных новорожденных. Целью настоящего исследования было изучить влияние антиоксидантов в составе липосом из яичного лецитина при их ингаляционном введении на показатели окислительного стресса в легких новорожденных морских свинок в условиях экспериментальной гипероксии (трое суток). В качестве материала для исследования использовали бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ). Ингаляционное введение липосом, содержащих N-ацетилцистеин и  $\alpha$ -токоферол, в условиях экспериментальной гипероксии способствовало подавлению продукции активных форм кислорода клетками, нормализации активности глутатионпероксидазы и содержания карбонильных производных и не влияло на уровень диеновых конъюгатов в БАЛЖ. Введение липосом, содержащих ретиноиды (ретинол и ретиноевую кислоту), в условиях гипероксии сопровождалось нормализацией активности глутатионпероксидазы и содержания продуктов окислительной модификации белков в БАЛЖ, при этом интенсивность генерации активных форм кислорода оставалась повышенной, а уровень диеновых конъюгатов и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, превышал показатели животных, подвергавшихся изолированному действию гипероксии. Таким образом, ингаляционное введение липосом, содержащих ретиноиды и яичный лецитин, оказывало не только анти-, но и прооксидантное действие в легких в условиях гипероксии, в отличие от липосомных форм N-ацетилцистеина и  $\alpha$ -токоферола.

**Ключевые слова:** липосомы, легкие, гипероксия, антиоксиданты, фосфатидилхолин

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Таганович А.Д. Показатели окислительного стресса в легких при ингаляционном введении липосом на основе яичного лецитина в условиях экспериментальной гипероксии. *Биомедицина*. 2019;15(3):49–58. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-3-49-58>

Поступила 07.03.2019

Принята после доработки 03.06.2019

Опубликована 10.09.2019

## OXIDATIVE STRESS MARKERS IN THE LUNGS UNDER EXPERIMENTAL HYPEROXIA WITH INHALED LIPOSOMES BASED ON EGG LECITHIN

Irina L. Kotovich\*, Zhanna A. Rutkovskaya, Anatoliy D. Taganovich

Belarusian State Medical University  
220116, Republic of Belarus, Minsk, Dzerzhinskogo avenue, 83

Oxidative stress is considered to be a factor leading to lung damage in premature infants. The aim of this study was to investigate the effect of inhaled antioxidants incorporated into egg lecithin liposomes on the indicators of oxidative stress in the lungs of newborn guinea pigs under experimental hyperoxia (3 days). Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was used as a material for the study. Under hyperoxia exposure, inhalation of liposomes containing N-acetylcysteine and alpha-tocopherol contributed to the suppression of the reactive oxygen species production by cells, normalization of glutathione peroxidase activity and carbonyls content, while not affecting the level of diene conjugates in BALF. The introduction of retinoid-containing liposomes (retinol and retinoic acid) under hyperoxia was accompanied by normalization of glutathione peroxidase activity as well as the content of protein oxidation products in BALF, while the generation of reactive oxygen species remained enhanced, and the diene conjugates and thiobarbituric acid reactive products exceeded the levels in animals exposed to hyperoxia alone. Thus, the inhaled liposomes containing retinoids and egg lecithin exhibit not only anti-, but also a prooxidant effect in the lungs under hyperoxia exposure, unlike the liposomal forms of N-acetylcysteine and alpha-tocopherol.

**Keywords:** liposomes, lungs, hyperoxia, antioxidants, phosphatidylcholine

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Kotovich I.L., Rutkovskaya Zh.A., Taganovich A.D. Oxidative Stress Markers in the Lungs under Experimental Hyperoxia with Inhaled Liposomes Based on Egg Lecithin. *Journal Biomed.* 2019;15(3):49–58. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-3-49-58>

Submitted 07.03.2019

Revised 03.06.2019

Published 10.09.2019

## Введение

Использование высоких концентраций кислорода при выхаживании недоношенных новорожденных является одним из факторов, способствующих развитию у детей тяжелой хронической патологии — бронхолегочной дисплазии (БЛД) [7]. Проблема профилактики и фармакологический коррекции данной патологии остается нерешенной до настоящего времени. Не в последнюю очередь это обусловлено пробелами в понимании патогенетических механизмов, вовлеченных в развитие БЛД на разных стадиях.

Окислительный стресс традиционно рассматривают как один из важнейших факторов, приводящих к повреждению легких у новорожденных. В перинатальном периоде имеется целый ряд предпосылок к развитию оксидантного стресса: применяемая при выхаживании недоношенных новорожденных повышенная концентрация кислорода, дефицит антиоксидантов, высокий уровень несвязанного железа, инфекции и ответная реакция иммунокомпетентных

клеток, длительное воспаление [9, 16]. В этой связи изучение возможности защиты легких новорожденных от повреждения оксидантами представляется весьма перспективным. Результаты проведенных ранее исследований в этом направлении неоднозначны. Предпринимались попытки профилактики БЛД за счет коррекции оксидантно-антиоксидантного равновесия с помощью внутривенного введения N-ацетилцистеина, витамина А и его производных (внутримышечно), витамина Е (перорально), Cu-Zn-супероксиддисмутазы (СОД) (ингаляционно) [8, 10, 19, 20]. За исключением последнего способа, эффективность была незначительной. Вероятной причиной может быть то, что способы введения (кроме ингаляционного) не обеспечивали доставку препаратов в достаточном количестве в легкие [14]. Ингаляционный путь обладает и другими преимуществами — он неинвазивен и безопасен.

Еще одним подходом, повышающим эффективность препаратов, считается их

включение в липосомы [17]. Липосомы являются биосовместимыми, биodeградируемыми и нетоксичными. Липосомная форма облегчает проникновение веществ в клетки и увеличивает продолжительность их действия. Такой способ подходит для переноса как гидрофильных, так и гидрофобных и амфифильных молекул. При заболеваниях легких липосомы в форме аэрозоля могут быть эффективным средством доставки веществ к клеткам альвеолярного эпителия. Как показывают эксперименты на животных и исследование, проведенное с помощью добровольцев, ингаляционное введение липосом хорошо переносится, не оказывает негативного влияния на функциональные показатели легких и не дает побочных эффектов [18].

Ранее нами было показано, что ингаляционное введение липосом, приготовленных на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и содержащих  $\alpha$ -токоферол или ретиноиды в своем составе, эффективно подавляет окислительный стресс, индуцированный действием гипероксии в легких [4]. Учитывая высокую стоимость препаратов ДПФХ, в настоящем исследовании мы изучили эффекты липосом, приготовленных на основе менее дорогостоящего фосфатидилхолина природного происхождения, выделенного из яичного желтка (ЯФХ).

**Цель** настоящего исследования — изучить влияние антиоксидантов в составе липосом из яичного лецитина при их ингаляционном введении на показатели окислительного стресса в легких в условиях экспериментальной гипероксии.

## Материалы и методы

### Материалы

Эксперимент проводили с использованием новорожденных морских свинок, которые вместе с кормящими матерями находились на стандартном рационе вивария БГМУ с постоянным доступом к пи-

тывеюй воде. При выполнении данного исследования строго соблюдали этические нормы и правила работ с лабораторными животными. Морские свинки были выбраны для исключения влияния на изучаемые показатели эндогенной аскорбиновой кислоты — антиоксиданта, который не синтезируется у морских свинок, как и у человека.

Для создания условий гипероксии животных в течение 1 сут после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которую постоянно подавали кислород. Концентрацию кислорода контролировали с помощью портативного анализатора кислорода ПГК-06-100Р (ЗАО «Инсовт», РФ) и поддерживали на уровне не менее 70%. Длительность воздействия гипероксии составляла 3 сут. В течение дня камеру один раз открывали на 20 мин для чистки клетки, кормления животных и проведения ингаляций в соответствующих группах. Животные контрольной группы дышали обычным воздухом.

**Группы исследования.** Были сформированы следующие группы: «контроль» (n=8), «гипероксия» (n=10), «гипероксия + N-ацетилцистеин-ЯФХ» (n=4), «гипероксия +  $\alpha$ -токоферол-ЯФХ» (n=4), «гипероксия + ретиноиды-ЯФХ» (n=5) и «гипероксия + ЯФХ» (n=4) (последняя группа получала с ингаляциями т. н. «пустые» липосомы).

Приготовление, состав и введение ингаляционной смеси. Ингаляционная смесь содержала многослойные липосомы, которые готовили методом механического диспергирования [11] непосредственно перед применением, и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4. Использовались реагенты высокой степени очистки («Sigma-Aldrich», Германия; p-p N-ацетилцистеина для ингаляций, «Белмедпрепараты», Беларусь).

В группе «гипероксия + N-ацетилцистеин-ЯФХ» смесь для ингаляций включала

липосомы, содержащие N-ацетилцистеин (250 мг/кг) и ЯФХ (L- $\alpha$ -фосфатидилхолин из яичного желтка,  $\geq 99\%$ ) (50 мг/кг).

В группе «гипероксия +  $\alpha$ -токоферол-ЯФХ» животные получали липосомы, содержащие  $\alpha$ -токоферол (12,5 мг/кг) и ЯФХ (45 мг/кг).

В группе «гипероксия + ретиноиды-ЯФХ» липосомная смесь содержала полностью транс-ретинол (6 мг/кг), полностью транс-ретиноевую кислоту (0,6 мг/кг), ЯФХ (45 мг/кг).

В группе «гипероксия + ЯФХ» вводили липосомы, содержащие только ЯФХ (50 мг/кг).

Ингаляции проводили с использованием компрессорного небулайзера ComrAir (NE-C28-E, Omron, Китай). Ингаляции проводили 1 раз в два дня, всего дважды в течение 3-х сут воздействия гипероксии.

Получение материала для исследования. Не ранее чем через 22 ч после последнего введения препаратов животных наркотизировали (тиопентал натрия внутривенно, 15 мг/кг), промывали легкие через эндотрахеальный зонд трижды по 8 мл 0,9% р-ром NaCl и получали бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ) для исследования.

## Методы

**Общий белок в БАЛЖ** определяли по Лоури.

**Продукцию клетками активных форм кислорода (АФК)** изучали методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Клетки БАЛЖ осаждали центрифугированием при 200 g, 4°C в течение 10 мин (рефрижераторная центрифуга РС-6, Кыргызстан). Полученный осадок ресуспендировали в среде Эрла и проводили подсчет клеточных элементов. 1 мл клеточной суспензии ( $2,0 \times 10^6$ /мл) с добавлением 50 мкл 0,1 М CaCl<sub>2</sub> и 50 мкл 0,5 мМ люминола вносили в стеклянную кювету для регистрации хемилюминесценции. Регистрировали про-

дукцию АФК клетками при адгезии к стеклянной поверхности без внесения дополнительных стимуляторов в течение 20 мин (биохемилюминиметр БХЛ-1, Минск, Беларусь). Запись и анализ кинетических кривых проводили с помощью компьютерной программы NAS UniChrom (Беларусь). Показатель интенсивности генерации АФК рассчитывали как площадь под кривой ЛЗХЛ за установленный период времени и выражали в отн. ед.

Определяли содержание первичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в БАЛЖ — диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и др. продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой; а также продуктов окислительной модификации белков — карбонильных производных аминокислот.

Для определения **содержания диеновых конъюгатов (ДК)** использовали метод, основанный на экстракции этих соединений смесью равных объемов гептана и изопропанола [1]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре (Solar, РБ) против соответствующего контроля при 220 нм (соединения с изолированными двойными связями) и 232 нм (ДК). Для оценки относительного содержания ДК рассчитывали величину отношения оптической плотности  $E_{232}/E_{220}$ . Результат выражали в отн. ед.

**Определение продуктов, реагирующих с ТБК (ТБК-РП)**, проводили колориметрическим методом [2]. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически против соответствующего контроля при 532 нм. При расчетах учитывали коэффициент молярной экстинкции  $1,56 \times 10^5$  моль<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup> и содержание общего липидного фосфора в пробе. Результат выражали в отн. ед.

**Определение окислительной модификации белков** проводили по методу, описанному Е.Е. Дубининой [3]. Метод основан на реакции взаимодействия карбонильных производных окисленных аминокислот-

ных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином. Образование окрашенных 2,4-динитрофенилгидразонов регистрировали спектрофотометрически при 360 нм. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции  $22 \times 10^3 \text{ моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ . Содержание карбонильных производных в БАЛЖ выражали в нмоль/мг белка.

**Активность супероксиддисмутазы (СОД)** определяли спектрофотометрически с использованием аналитических наборов («Анализ Х», Беларусь). Метод основан на ингибировании супероксидзависимого окисления кверцетина в присутствии СОД. Активность СОД выражали в нМ/мин/мг белка.

**Активность каталазы** определяли спектрофотометрическим методом [5]. В основе метода лежит способность пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стабильный окрашенный комплекс, который регистрируется при 410 нм. Активность фермента выражали в нМ/мин/мг белка.

**Активность глутатионпероксидазы в БАЛЖ** определяли по методу В.М. Моина [6]. Скорость глутатионпероксидазной реакции оценивали по количеству непрореагировавшего восстановленного глутатиона, который определяли реакцией с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. Спектрофотометрировали пробы против соответствующего контроля при 412 нм. Активность выражали в нМ/мин/мг белка.

**Статистическую обработку** данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10,0. Для анализа данных на первом этапе определяли нормальность распределения цифровых показателей в группах с использованием критерия Шапиро — Уилка. Дальнейший статистический анализ проводили с использованием непараметрического U-теста Манна — Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представ-

лены в виде медианы и интерквартильных размахов (25–75 процентиля).

## Результаты исследований

Данные, полученные в ходе исследования, представлены в табл. 1 и 2. Интенсивность генерации АФК клетками БАЛЖ новорожденных морских свинок, находившихся в условиях гипероксии 3 сут, была выше, чем у контрольных животных, в 2,3 раза,  $p < 0,05$  (табл. 1). Введение «пустых» липосом, а также липосом, содержащих ретиноиды и ЯФХ, на фоне гипероксии не оказывало достоверного влияния на продукцию АФК клетками. После введения липосом, содержащих N-ацетилцистеин и ЯФХ, а также  $\alpha$ -токоферол и ЯФХ, регистрируемая интенсивность ЛЗХЛ снижалась и достоверно не отличалась от контрольных значений.

Уровень первичных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов — был достоверно повышен в БАЛЖ всех групп животных, подвергавшихся гипероксии (табл. 1). Причем наиболее высокий уровень диеновых конъюгатов был выявлен в группе, получавшей ингаляции с ретинолом и ретиноевой кислотой в составе липосом (в 6,5 раз выше по сравнению с контролем и в 2,4 раза выше по сравнению с группой «гипероксия», различия в обоих случаях статистически достоверны). Введение липосом с ретиноидами на фоне гипероксии (в отличие от всех др. изучаемых воздействий) сопровождалось также увеличением содержания малонового диальдегида и др. ТБК-РП, в БАЛЖ (в 2 раза по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ).

Воздействие гипероксии в течение трех сут приводило к значительному росту медианного уровня карбонильных производных аминокислот в белках БАЛЖ (в 4,5 раза по сравнению с уровнем контроля,  $p < 0,05$ ) (табл. 1). После введения «пустых» липосом данный показатель оставался повышенным, тогда как липосомные формы

**Таблица 1.** Генерация активных форм кислорода и уровень продуктов окислительной модификации липидов и белков в БАЛЖ новорожденных морских свинок при ингаляционном введении липосом различного состава в условиях гипероксии

**Table 1.** Generation of reactive oxygen species and the level of products of oxidative modification of lipids and proteins in BALF of newborn guinea pigs with inhalation administration of liposomes of different composition under conditions of hyperoxia

Группа	АФК, отн. ед.	ДК, отн. ед.	ТБК-РП, отн. ед.	Карбонильные производные, нмоль/мг белка
Контроль	8,6 (6,9–11,4)	1,3 (1,0–1,4)	8,9 (8,2–15,0)	13,2 (10,7–37,6)
Гипероксия	20,2 (17,2–25,7)*	3,6 (2,2–4,4)*	12,3 (10,3–17,0)	60,1 (36,0–73,6)*
Гипероксия + ЯФХ	20,4 (18,6–23,0)*	4,5 (3,6–5,4)*	8,2 (7,1–10,4)	55,7 (49,5–77,9)*
Гипероксия + N-ацетилцистеин-ЯФХ	10,9 (9,0–12,8)#	3,9 (3,3–4,6)*	11,2 (10,1–14,2)	24,5 (22,8–29,7)*
Гипероксия + $\alpha$ -токоферол-ЯФХ	15,4 (8,2–22,4)	4,5 (2,9–5,1)*	13,5 (10,5–18,4)	26,0 (23,5–30,0)*
Гипероксия + ретиноиды-ЯФХ	27,1 (20,7–35,7)*	8,5 (7,6–9,4)*	18,2 (16,7–19,5)*	24,2 (23,2–26,7)*

**Примечание:** ЯФХ — яичный фосфатидилхолин; АФК — активные формы кислорода; ДК — диеновые конъюгаты; ТБК-РП — продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой «контроль»; # —  $p < 0,05$  по сравнению с группой «гипероксия».

**Note:** ЯФХ — egg phosphatidylcholine; АФК — reactive oxygen species; ДК — diene conjugates; ТБК-РП — products that react with thiobarbituric acid; \* —  $p < 0.05$  compared with the control group; # —  $p < 0.05$  compared with the group “hyperoxia”.

N-ацетилцистеина,  $\alpha$ -токоферола и ретиноидов в равной степени способствовали нормализации уровня карбонильных производных в БАЛЖ.

Установлено достоверное снижение активности глутатионпероксидазы в БАЛЖ у животных, подвергавшихся гипероксии, до 43% от уровня контроля (табл. 2). В группах животных, получавших ингаляции с липосомами, содержащими ЯФХ и N-ацетилцистеин, токоферол и ретиноиды, активность глутатионпероксидазы восстанавливалась и достоверно не отличалась от группы «контроль». «Пустые» липосомы такого влияния не оказывали. Различий между изучаемыми группами в активности СОД и каталазы в БАЛЖ выявлено не было.

## Обсуждение результатов

В данной работе изучалось влияние липосом, приготовленных на основе фосфолипида природного происхождения — фосфатидилхолина из яичного желтка — и препаратов, обладающих антиокси-

дантной активностью (N-ацетилцистеин,  $\alpha$ -токоферол, ретиноиды), на оксидантный статус легких в условиях гипероксии. При проведении исследования мы базировались на ранее полученных данных об эффективном подавлении окислительного стресса, вызванного длительной гипероксией в легких, при ингаляционном введении липосом, состоящих из ДПФХ и  $\alpha$ -токоферола или ДПФХ и ретиноидов [4]. Замена основного липидного компонента липосом на яичный фосфатидилхолин имеет экономическую целесообразность, однако изменения оксидантно-антиоксидантного баланса в легких в условиях гипероксии и введения фосфолипидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты (в отличие от ДПФХ), требовали отдельного изучения.

«Пустые» липосомы, состоящие из ЯФХ, не оказывали влияния на изменения в легких новорожденных морских свинок, вызванные действием гипероксии: продукция АФК клетками, уровни продуктов ПОЛ, окисли-



**Таблица 2.** Активность СОД, каталазы и глутатионпероксидазы в БАЛЖ новорожденных морских свинок после введения липосом на фоне гипероксии

**Table 2.** The activity of SOD, catalase and glutathione peroxidase in BALF of newborn guinea pigs after the administration of liposomes against the background of hyperoxia

Группа	СОД, нмоль/мин/мг белка	Каталаза, нмоль/мин/мг белка	Глутатионпероксидаза, нмоль/мин/мг белка
Контроль	44,5 (42,6–57,4)	0,28 (0,21–0,46)	86,5 (62,8–99,0)
Гипероксия	47,1 (37,5–61,3)	0,35 (0,27–0,42)	37,2 (12,1–65,5)*
Гипероксия + ЯФХ	37,7 (36,7–48,6)	0,22 (0,21–0,37)	30,1 (27,9–39,2)*
Гипероксия + N-ацетилцистеин-ЯФХ	47,2 (38,2–52,4)	0,30 (0,28–0,34)	70,0 (47,2–103,3)
Гипероксия + α-токоферол-ЯФХ	51,4 (40,9–68,9)	0,34 (0,25–0,45)	94,9 (42,7–128,9)#
Гипероксия + ретиноиды-ЯФХ	45,0 (41,4–50,0)	0,32 (0,30–0,33)	79,4 (30,3–126,4)

**Примечание:** ЯФХ — яичный фосфатидилхолин; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой «контроль»; # —  $p < 0,05$  по сравнению с группой «гипероксия».

**Note:** ЯФХ — egg phosphatidylcholine; \* —  $p < 0.05$  compared with the control group; # —  $p < 0.05$  compared with the group “hyperoxia”.

тельной модификации белков и активности антиоксидантных ферментов в БАЛЖ не отличались от группы «гипероксия».

Эффекты ингаляционного введения известных антиоксидантов α-токоферола и N-ацетилцистеина в составе липосом из ЯФХ на фоне гипероксии были однонаправленными: наблюдались снижение продукции АФК клетками, нормализация активности глутатионпероксидазы, подавление окислительной модификации белков (в пользу этого свидетельствует отсутствие роста уровня карбонильных производных в БАЛЖ) при сохранении повышенного уровня первичных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов. Следует отметить, что при использовании липосом из ДПФХ и α-токоферола на фоне воздействия гипероксии в течение 3 сут (в отличие от 14 сут воздействия) также не отмечалось нормализации уровня диеновых конъюгатов, кроме того, уровень карбонильных производных в белках оставался повышенным [4], т. е. липосомы из ЯФХ оказались более эффективными в отношении подавления окислительного повреждения белков в бронхоальвеолярном пространстве.

Предположительно, более выраженный эффект липосом, состоящих из ЯФХ, обусловлен изменением свойств их мембранных слоев. В работе [13] было показано, что токоферол спонтанно перемещается между слоями фосфолипидов и может переходить с липосом на мембраны клеток даже без поглощения липосомных частиц. Причем такой межмембранный переход выражен в большей степени, если липосомы содержат ненасыщенные жирные кислоты. Нельзя исключить, что наличие ненасыщенных жирных кислот в липидных слоях липосом, за счет увеличения их проницаемости, повышает доступность и водорастворимых компонентов, включенных в их состав (в частности, N-ацетилцистеина).

Интересные результаты были получены при исследовании влияния липосом, содержащих ЯФХ и ретиноиды. Мы обнаружили, что в условиях гипероксии ингаляционное введение липосом такого состава не влияет на интенсивность продукции АФК клетками — она остается повышенной и даже имеет тенденцию к росту по сравнению с изолированным действием гипероксии. Кроме того, увеличивается ко-

личество диеновых конъюгатов и продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в БАЛЖ. При этом имеет место повышение активности глутатионпероксидазы до контрольных значений и снижение уровня карбонильных производных, т. е. можно говорить о сочетании про- и антиоксидантных эффектов ретиноидов в изучаемых условиях. При использовании липосом на основе ДПФХ и ретиноидов прооксидантное действие не проявлялось [4].

В основе обнаруженных эффектов ретиноидов могут лежать следующие обстоятельства. Известно, что антиоксидантные эффекты витамина А и его производных обусловлены их способностью взаимодействовать со свободными радикалами и, тем самым, уменьшать их количество, а также влиянием на экспрессию антиоксидантных ферментов. Полученные нами данные согласуются с результатами др. исследователей, продемонстрировавших индукцию секреторной формы глутатионпероксидазы в миобластах под влиянием ретиноидов [12]. Окисление же двойных связей в ретиноидах под действием свободных радикалов сопровождается образованием пероксидных продуктов, которые сами по себе могут стимулировать процессы ПОЛ. Ненасыщенные жирные кислоты в составе яичного лецитина также подвержены перекисному окислению и могут служить дополнительным источником продуктов ПОЛ. Вероятно, это является причиной роста в БАЛЖ уровня диеновых конъюгатов и продуктов, реагирующих с ТБК, после введения липосом, содержащих ЯФХ и ретиноиды, в условиях гипероксии.

Имеются противоречивые данные о характере влияния ретиноидов на продукцию АФК клетками. Ранее была показана способность ретиноевой кислоты подавлять продукцию супероксидного анион-радикала и пероксида водорода *in vitro* на клетках, выделенных из крови (нейтрофилах и макрофагах) [21]. В то же время в работе [15]

сообщается об усилении образования АФК *in vitro* и *in vivo* в различных тканях (мозг, печень, легкие) в присутствии витамина А и его производных вследствие набухания и нарушения организации внутренней митохондриальной мембраны и изменения работы комплексов дыхательной цепи. Таким образом, анализ литературы и результатов наших экспериментов позволяет заключить, что эффект ретиноидов в отношении баланса редокс-систем может быть разнонаправленным и, вероятно, в значительной степени зависит от др. факторов, включая дозировки препаратов, условия эксперимента, присутствие иных соединений с анти- и прооксидантными свойствами.

## Выводы

В условиях экспериментальной гипероксии продолжительностью 3 сут ингаляционное введение липосом на основе фосфатидилхолина из яичного желтка, содержащих N-ацетилцистеин и  $\alpha$ -токоферол, способствует подавлению продукции активных форм кислорода клетками, нормализации активности глутатионпероксидазы и содержания карбонильных производных и не влияет на уровень диеновых конъюгатов в БАЛЖ.

Введение липосом, содержащих яичный фосфатидилхолин и ретиноиды (ретинол и ретиноевую кислоту), в условиях гипероксии сопровождается нормализацией активности глутатионпероксидазы и содержания продуктов окислительной модификации белков в БАЛЖ, при этом интенсивность генерации АФК остается повышенной, а уровень продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) превышает показатели животных, подвергавшихся действию только гипероксии в течение 3 сут. Можно констатировать, что комбинация ретиноидов и яичного лецитина оказывает не только анти-, но и прооксидантное действие в условиях гипероксии.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989;35(1):127–135. [Volchegorskij I.A., Nalimov A.G., Yarovinskij B.G., Lifshits R.I. Sopotavlenije razlichnyh podhodov k opredeleniyu produktov perekisnogo okisleniya lipidov v heptan-isopropanol'nyh ekstraktah krvi [Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol blood extracts]. *Voprosy medicinskoj himii* [Questions of Medical Chemistry]. 1989;35(1):127–135. (In Russian)].
2. Гончаренко М.С., Латина А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов. *Лабораторное дело*. 1985;1:60–61. [Goncharenko M.S., Latina A.M. Metod otsenki perekisnogo okisleniya lipidov [Method of lipid peroxidation assessment]. *Laboratornoje delo* [Laboratory Work]. 1985;1:60–61. (In Russian)].
3. Дубинина Е.Е. *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, создание и разрушение*. СПб.: Медицинская пресса, 2006. 400 с. [Dubinina E.E. *Produkty metabolizma kisloroda v funkcionalnoj aktivnosti kletok. Zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie* [Oxygen metabolism products in the functional activity of cells. Life and death, creation and destruction]. Saint Petersburg: Medicinskaya pressa, 2006. 400 p. (In Russian)].
4. Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Таганович А.Д. Коррекция оксидантно-антиоксидантного баланса в легких при гипероксии с использованием липосомных форм альфа-токоферола и ретиноидов в эксперименте. *Биомедицинская химия*. 2017;63(4):289–295. [Kotovich I.L., Rutkovskaya Zh.A., Taganovich A.D. Korrekciya oksidantno-antioksidantnogo balansa v lgokih pri giperoksii s ispolzovaniem liposomnyh form alfa-tokoferola i retinoidov v eksperimente [Correction of oxidant-antioxidant balance in lungs during hyperoxia using liposomal alpha-tocopherol and retinoids in the experiment]. *Biomeditsinskaya himiya* [Biomedical Chemistry]. 2017;63(4):289–295. (In Russian)].
5. Мамонтова Н.С., Белобородова Э.И., Тюкалова Л.И. Активность каталазы при хроническом алкоголизме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1994;1:27–28. [Mamontova N.S., Beloborodova E.I., Tyukalova L.I. Aktivnost katalazy pri hronicheskom alkoholizme [Catalase activity in chronic alcoholism]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Clinical Laboratory Diagnostics]. 1994;1:27–28. (In Russian)].
6. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лабораторное дело*. 1986;12:724–727. [Moin V.M. Prostoj i specificheskij metod opredeleniya aktivnosti glutatioperoksidazy v eritrocitah [A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes]. *Laboratornoje delo* [Laboratory Work]. 1986;12:724–727. (In Russian)].
7. Овсянников Д.Ю., Петрук Н.И., Кузьменко Л.Г. Бронхолегочная дисплазия у детей. *Педиатрия*. 2004;1:3–8. [Ovsyannikov D.Yu., Petruk N.I., Kuz'menko L.G. Bronholegichnaya displaziya u detej [Bronchopulmonary dysplasia in children]. *Pediatriya* [Pediatrics]. 2004;1:3–8. (In Russian)].
8. Ahola T., Lapatto R., Raivio K.O., Selander B., Stigson L., Jonsson B., et al. N-acetylcysteine does not prevent bronchopulmonary dysplasia in immature infants: a randomized controlled trial. *J. Pediatr*. 2003;143(6):713–719.
9. Chang L.-Y., Subramaniam M., Yoder B.A., Day B.J., Ellison M.C., Sunday M.E., et al. A catalytic antioxidant attenuates alveolar structural remodeling in bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2003;167:57–64.
10. Davis J.M., Parad R.B., Michele T., Allred E., Price A., Rosenfeld W. Pulmonary outcome at 1 year corrected age in premature infants treated at birth with recombinant human CuZn superoxide dismutase. *Pediatrics*. 2003;111(3):469–476.
11. Dua J.S., Rana A.C., Bhandari A.K. Liposome: methods of preparation and applications. *Int. J. Pharm. Studies and Res*. 2012;3:14–20.
12. Haddad M.E., Jean E., Turki A., Hugon G., Vernus B., Bonniou A., et al. Glutathione peroxidase 3, a new retinoid target gene, is crucial for human skeletal muscle precursor cell survival. *J. Cell Science*. 2012;125:6147–6156.
13. Kagan V., Bakalova R., Zhelev Z., Rangelova D., Serbinova E., Tyurin V., et al. Intermembrane transfer and antioxidant action of alpha-tocopherol in liposomes. *Arch. Biochem. Biophys*. 1990;280:147–152.
14. Nagata K., Iwasaki Y., Yamada T., Yuba T., Kono K., Hosogi S., et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase by N-acetylcysteine in hyperoxic lung injury. *Respir. Med*. 2007;101(4):800–807.
15. Oliveira M.R. Vitamin A and retinoids as mitochondrial toxicants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015. Article ID 140267. DOI: 10.1155/2015/140267.
16. Spears K., Cheney C., Zerzan J. Low plasma retinol concentrations increase the risk of developing bronchopulmonary dysplasia and long-term respiratory disability in very-low-birth-weight infants. *Am. J. Clin. Nutr*. 2004;80:1589–1594.
17. Suntres Z.E. Liposomal antioxidants for protection against oxidant-induced damage. *J. Toxicol*. 2011;16. ID 152474.
18. 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):1268–1270.

19. Tyson J.E., Wright L.L., Oh W., Kennedy K.A., Mele L., Ehrenkranz R.A., et al. Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants. National Institute of child health and human development neonatal research network. *New Engl. J. Med.* 1999;340(25):1962–1968.
20. Watts J.L., Milner R., Zipursky A., Paes B., Ling E., Gill G., et al. Failure of supplementation with vitamin E to prevent bronchopulmonary dysplasia in infants less than 1500 g birth weight. *Eur. Resp. J.* 1991;4(2):188–190.
21. Wolfson M., Shinvwel E.S., Zvillich M., Rager-Zisman B. Inhibitory effect of retinoic acid on the respiratory burst of adult and cord blood neutrophils and macrophages: potential implication to bronchopulmonary dysplasia. *Clin. Exp. Immunol.* 1988;72:505–509.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Котович Ирина Леонидовна\***, к.м.н., доц., УО «Белорусский государственный медицинский университет»;  
e-mail: [kotovich-iryna@rambler.ru](mailto:kotovich-iryna@rambler.ru)

**Irina L. Kotovich\***, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Belarusian State Medical University;  
e-mail: [kotovich-iryna@rambler.ru](mailto:kotovich-iryna@rambler.ru)

**Рутковская Жанна Александровна**, к.м.н., доц., УО «Белорусский государственный медицинский университет»

**Zhanna A. Rutkovskaya**, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Belarusian State Medical University

**Таганович Анатолий Дмитриевич**, д.м.н., проф., УО «Белорусский государственный медицинский университет»

**Anatoliy D. Taganovich**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Belarusian State Medical University

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author