

СУРФАКТАНТНАЯ СИСТЕМА ЛЕГКИХ ПРИ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ИММУНОСУПРЕССОРА FTY-720

Уракова М.А., Мустаев В.Р., Каримова Г.Р., Кузнецова М.Г.,
Рахматуллина Э.Н., Оленева С.А., Уракова К.В.

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ижевск, Россия

Резюме. Антифосфолипидный синдром (APS) является тромбофилическим заболеванием, в патогенезе которого ведущая роль принадлежит антителам, реагирующим с антигенными детерминантами фосфолипидов. APS – это системная аутоиммунная патология, которая вовлекает в патологический процесс многие органы и системы, в том числе и дыхательную систему. Учитывая тот факт, что сурфактант легких представлен в основном фосфолипидами, можно предположить повреждение сурфактанта и нарушение его функционирования при APS. В работе показана эффективность применения терапии данной аутоиммунной патологии иммуносупрессором FTY-720, который представляет собой структурный аналог эндогенного сфингозина. Действие препарата основано на модуляции сфингозин-1 фосфатных рецепторов лимфоцитов. Основным эффектом иммуносупрессора FTY-720 в результате рецепторного взаимодействия является снижение количества циркулирующих лимфоцитов. Исследования были проведены на 85 белых беспородных крысах-самцах: 1-я группа (моделирование APS) состояла из 30 крыс, которым внутривенно вводили кардиолипидный антиген в суммарной дозе 0,2-0,4 мг на крысу через день в течение трех недель, 2-я группа (контроль) состояла из 25 крыс, которым вводили 0,9%-ный раствор NaCl по той же схеме; в 3-ю группу вошло 30 крыс, которым APS сочетали с введением иммуносупрессора FTY-720 (внутрибрюшинно 1 мг/кг массы животного). Через 3 недели с целью извлечения бронхолегочного комплекса производилось оперативное вмешательство, которое осуществляли под наркозом («Золетил» 0,5 мг/кг). После извлечения бронхолегочного комплекса осуществлялся его трехкратный лаваж 0,9%-ным раствором NaCl. Материалом экспериментального исследования служила лаважная жидкость, в которой изучали биофизические и биохимические показатели сурфактанта. Используя метод Ленгмюра-Блоджетта, опре-

Адрес для переписки:

Уракова Мария Анатольевна
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская
академия» Министерства здравоохранения РФ
426056, Россия, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281.
Тел.: 8 (951) 210-22-07.
E-mail: urakova-mariya@yandex.ru

Address for correspondence:

Maria A. Urakova
Izhevsk State Medical Academy
281 Kommunarov St
Izhevsk
426056 Russian Federation
Phone: +7 (951) 210-22-07.
E-mail: urakova-mariya@yandex.ru

Образец цитирования:

М.А. Уракова, В.Р. Мустаев, Г.Р. Каримова,
М.Г. Кузнецова, Э.Н. Рахматуллина, С.А. Оленева,
К.В. Уракова «Сурфактантная система легких
при антифосфолипидном синдроме в условиях
введения иммуносупрессора FTY-720» // Российский
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 151-156.
doi: 10.46235/1028-7221-16767-SSO

© Уракова М.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.A. Urakova, V.R. MustaeV, G.R. Karimova,
M.G. Kuznetsova, E.N. Rakhmatullina, S.A. Oleneva,
K.V. Urakova "Surfactant system of the lungs in
antiphospholipid syndrome under the conditions of
administration of the immunosuppressive agent FTY-720",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 151-156.
doi: 10.46235/1028-7221-16767-SSO

© Urakova M.A. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16767-SSO

деляли статистическое, минимальное и максимальное поверхностное натяжение. Исходя из данных величин рассчитывали интегративный показатель, отражающий поверхностно-активные свойства сурфактанта – индекс стабильности по Clements. Методом тонкослойной хроматографии определяли фракционный состав фосфолипидов сурфактанта. Результаты наших экспериментов показали, что при антифосфолипидном синдроме наблюдалось ухудшение функциональной активности сурфактанта и изменение его биохимического состава. Введение FTY-720 нормализовало параметры сурфактантной системы легких, измененные при моделировании антифосфолипидного синдрома.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, иммуносупрессор FTY-720, сурфактант легких, поверхностная активность легких

SURFACTANT SYSTEM OF THE LUNGS IN ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME UNDER THE CONDITIONS OF ADMINISTRATION OF THE IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT FTY-720

Urakova M.A., Mustaev V.R., Karimova G.R., Kuznetsova M.G., Rakhmatullina E.N., Oleneva S.A., Urakova K.V.

Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

Abstract. Antiphospholipid syndrome (APS) is a thrombophilic disease in the pathogenesis of which the leading role belongs to antibodies reacting with antigenic determinants of phospholipids. APS is a systemic autoimmune pathology that involves many organs and systems in the pathological process, including the respiratory system. Given the fact that the lung surfactant is mainly represented by phospholipids, it can be presented that the surfactant is damaged and its functioning is impaired in APS. The results of our experiments showed that in antiphospholipid syndrome, there was a decline in the functional activity of the surfactant and a change in its biochemical composition. The introduction of FTY-720 normalized the parameters of the lung surfactant system, which were changed during the modeling of antiphospholipid syndrome. The work shows the effectiveness of the therapy of this autoimmune pathology with immunosuppressor FTY-720, which is a structural analogue of endogenous sphingosine. The effect of the drug is based on the modulation of sphingosine-1 phosphate receptors of lymphocytes. The main effect of the immunosuppressor FTY-720 as a result of receptor interaction is a decrease in the number of circulating lymphocytes. The research involved 85 white random bred male rats: Group 1 (APS modeling) consisted of 30 rats who were intravenously injected with cardiolipin antigen at a total dose of 0.2-0.4 mg per rat every other day for three weeks; Group 2 (control) consisted of 25 rats who were injected with 0.9% NaCl solution according to the same scheme; and Group 3 including 30 rats in which APS was combined with the administration of the immunosuppressive agent FTY-720 (intraperitoneally 1 mg/kg of animal weight). Three weeks later, there was an operation conducted with the purpose of extraction of the bronchopulmonary complex. After extraction of the bronchopulmonary complex, its triple lavage was carried out with 0.9% NaCl solution. The material of the experimental study was a lavage liquid, in which the biophysical and biochemical parameters of the surfactant were studied. Langmuir–Blodgett method was used to identify static, minimal and maximal surface tension. These figures were used to identify integrative indicator reflecting surfactant characteristics – the Clements stability index. The fractional composition of surfactant phospholipids was determined by thin-layer chromatography. The results of our experiments showed that in antiphospholipid syndrome, there was a decline in the functional activity of the surfactant and a change in its biochemical composition. The introduction of FTY-720 normalized the parameters of the lung surfactant system, which were changed during the modeling of antiphospholipid syndrome.

Keywords: antiphospholipid syndrome, immunosuppressive agent FTY-720, lung surfactant, lung surface activity

Введение

В настоящее время проводится все больше исследований, подтверждающих высокую частоту встречаемости антифосфолипидного синдрома (АФС), что вызывает значительный интерес к данной аутоиммунной патологии [3]. Важно отметить, что АФС является приобретенным тромбофилическим заболеванием, при котором организм продуцирует аутоантитела как к фосфолипидсвязывающим белкам крови, так и к фосфолипидам, находящимся на клеточных мембранах [3]. На сегодняшний день антитела к фосфолипидам являются не только серологическими маркерами АФС, но и влияют на большинство процессов организма, в том числе связанных с мембранными фосфолипидами [3, 11]. Так, в исследованиях выявлено изменение сурфактантной системы легких при АФС у экспериментальных крыс [1, 4, 5].

Известно, что поверхность альвеолярного эпителия легких покрыта легочным сурфактантом, который представлен в основном фосфолипидами, в частности дипальмитоилфосфатидилхолином. Представляя собой незаменимый компонент альвеолярно-капиллярной мембраны, сурфактант играет важную роль в поддержании нормальной диффузионной способности легких, а также обеспечивает предотвращение ателектазирования альвеол [7]. Действие антифосфолипидных антител при АФС вызывает нарушение фосфолипидного состава и функций сурфактанта легких [3]. Экспериментальные исследования показали корректирующий эффект FTY-720 на нереспираторные функции легких и при других аутоиммунных заболеваниях [6].

В свете этого **целью нашего исследования** стало изучение воздействия иммуносупрессора FTY-720 на сурфактант легких в экспериментальной модели антифосфолипидного синдрома.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования были проведены на 85 крысах-самцах. При проведении опытов на лабораторных животных соблюдался международный этический кодекс, изложенный в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, а также в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Животные были разделены на следующие группы: 1-я группа (моделирование АФС) состояла из 30 крыс, которым внутривенно вводили кардиолипиновый антиген в суммарной дозе 0,2-0,4 мг на крысу через день в течение трех недель,

2-я группа (контроль) состояла из 25 крыс, которым вводили 0,9%-ный раствор NaCl по той же схеме; в 3-ю группу вошло 30 крыс, которым АФС сочетали с введением иммуносупрессора FTY-720 (внутрибрюшинно 1 мг/кг массы животного) [8].

Через 3 недели с целью извлечения бронхолегочного комплекса производилось оперативное вмешательство, которое осуществляли под наркозом («Золетил» 0,5 мг/кг). После извлечения бронхолегочного комплекса осуществлялся его трехкратный лаваж 0,9%-ным раствором NaCl. Материалом экспериментального исследования служила лаважная жидкость, в которой изучали биофизические и биохимические показатели сурфактанта. Используя метод Ленгмюра–Блуджетта, определяли статистическое, минимальное и максимальное поверхностное натяжение (ПН) [9]. Исходя из данных величин рассчитывали интегративный показатель, отражающий поверхностно-активные свойства сурфактанта – индекс стабильности по Clements.

$$\text{ИС по Clements (усл. ед.)} = \frac{2 \times (\text{ПН max} - \text{ПН min})}{(\text{ПН max} + \text{ПН min})}$$

Биохимическим методом оценки определяли содержание и фракционный состав фосфолипидов. Количественное определение фосфолипидов в БАС осуществляли по методу, в основе которого лежит экстракция липоидного фосфора смесью Блора (этиловый спирт и эфир в соотношении 3:1). При добавлении молибденово-кислого аммония и аскорбиновой кислоты определяли содержание фосфора по образованию молибденовой сини [2]. Измерение концентрации липоидного фосфора осуществлялось фотоколориметрическим методом. Разделение фосфолипидов на фракции производили методом тонкослойной хроматографии. Идентификацию различных классов фосфолипидов осуществляли с помощью стандартных фосфолипидных фракций (Avanti Polar Lipids, США): фосфатидилхолина (PC), сфингомиелина (SM), фосфатидилсерина (PS), фосфатидилэтаноламина (PE), фосфатидной кислоты (PA), лизофосфатидилхолина (LPC). С помощью денситометра «Сорбфил» (Россия) в УФ-диапазоне анализировали хроматограммы, с последующей их обработкой в программном обеспечении SPSS Statistics 22, для определения процентного содержания основных фосфолипидных фракций. Далее по содержанию общих фосфолипидов и процентному соотношению рассчитывали абсолютное содержание отдельных фракций.

Обработка статистических данных выполнена на основе пакета прикладных компьютерных программ Microsoft Excel 2010 и SPSS 22.

Результаты и обсуждение

В процессе экспериментального исследования было выявлено, что моделирование APS приводило к ухудшению поверхностной активности легких по сравнению с контролем: статическое ПН повышалось с 30,81 мН/м в контроле до 37,8 мН/м ($p < 0,05$) при APS, ПН min с 22,94 мН/м до 30,64 мН/м ($p < 0,01$) и ПН max с 40,06 мН/м до 43,63 мН/м ($p < 0,05$). Индекс по Clements альвеол снижался с 0,55 усл. ед. в контрольной группе до 0,37 усл. ед. при моделировании APS ($p < 0,05$).

Введение иммуносупрессора FTY-720 нивелировало изменения, характерные для APS. Параметры поверхностной активности сурфактанта были близки к контрольным значениям: статическое ПН составило 29,15 мН/м, ПН min 20,12 мН/м и ПН max 39,71 мН/м ($p > 0,05$). Исходя из данных ПН min и ПН max индекс стабильности альвеол повышался до 0,65 усл. ед. и также не отличался от контроля ($p > 0,05$).

Известно, что поверхностную активность сурфактанта определяет содержание общих фосфолипидов, где большую часть (до 70%) составляет наиболее поверхностно-активная фракция – PC [5, 10]. Можно предполагать, что повышение ПН БАС при экспериментальном моделировании APS могло быть связано с понижением уровня общих фосфолипидов сурфактанта до 15,87 мкмоль/г по сравнению с контрольным значением 32,47 мкмоль/г ($p < 0,001$). В то время как сочетание APS и иммуносупрессора FTY-720 увеличивало общее содержание фосфолипидов до 29,98 мкмоль/г, что не отличалось от контрольных величин ($p > 0,05$).

Изучение фракционного состава сурфактанта при APS показало, что уровень наиболее поверхностно-активной фракции – PC снижался с 20,81 мкмоль/г в контрольной группе до 8,06 мкмоль/г ($p < 0,01$). При этом также возрастал уровень LPC до 2,44 мкмоль/г по сравнению с контрольным значением 1,23 мкмоль/г ($p < 0,001$). Согласно литературным данным, LPC оказывает детергентное действие на сурфактант и играет важную роль в повреждении альвеолярного монослоя [12].

Одновременно при моделировании APS снижались следующие фракции: PS с 2,05 мкмоль/г до 0,79 мкмоль/г ($p < 0,001$), PE с 3,08 мкмоль/г

до 1,78 мкмоль/г ($p < 0,05$), PA с 1,80 мкмоль/г до 0,98 мкмоль/г ($p < 0,05$). Известно, что PA является основным источником фосфолипидов сурфактанта, главным образом PC [12]. Можно предположить, что снижение PA способствовало в свою очередь уменьшению PC. Коэффициент PC/LPC, отражающий распад PC до LPC также снижался.

Введение иммуносупрессора FTY-720 восстанавливало фракционный состав фосфолипидов сурфактанта легких, измененный при APS: увеличивался PC до 1,29 мкмоль/г ($p < 0,001$), снижался LPC до 0,98 мкмоль/г ($p < 0,001$), и нормализовывалось соотношение PC/LPC ($p < 0,001$). Также повышалось до контрольных величин содержание PS (1,29 мкмоль/г; $p > 0,05$), PE (2,57 мкмоль/г; $p > 0,05$), PA (1,39 мкмоль/г; $p > 0,05$).

Иммуносупрессор FTY-720 является веществом структурно-подобным липидному медиатору сфингозин-1-фосфату (S1P) [8]. Данное вещество в организме под действием сфингозин-фосфокиназы, в основном 2-го типа, превращается в активную форму FTY-720, которая действует первоначально как агонист S1P-рецептора на лимфоцитах. В дальнейшем FTY-720 индуцирует интернализацию и деградацию этого рецептора, тем самым блокируя сигнальные пути, необходимые для выхода лимфоцитов из лимфатической ткани. Основным эффектом иммуносупрессора FTY-720 в результате такого рецепторного взаимодействия является снижение количества циркулирующих лимфоцитов [8].

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что введение иммуносупрессора FTY-720 нивелирует степень нарушений сурфактанта легких, выявленных при моделировании APS.

Заключение

Таким образом, при антифосфолипидном синдроме изменяется фракционный состав фосфолипидов, наблюдается снижение содержания фосфатидилхолина – основной поверхностно-активной фракции, что влечет за собой ухудшение поверхностной активности легких. Введение иммуносупрессора FTY-720 восстанавливает показатели и функциональную активность системы сурфактанта легких, которые были изменены при моделировании аутоиммунного синдрома.

Список литературы / References

1. Брындина И.Г., Уракова М.А., Лебедева Н.В. Фосфолипиды эритроцитов, плазмы крови, сурфактанта и коагуляционная активность легких при экспериментальном антифосфолипидном синдроме // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3. С. 122. [Bryndina I.G., Urakova M.A., Lebedeva N.V., Phospholipids

of erythrocytes, blood plasma, surfactant and coagulation activity of the lungs in experimental antiphospholipid syndrome. *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, p. 122. (In Russ.)]

2. Кондрахин И.П., Архипов А.В., Левченко В.И. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. М.: Колос, 2004. 520 с. [Kondrahin I.P., Arhipov A.V., Levchenko V.I. Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics]. Moscow: Kolos, 2004. 520 p. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. М.: Литтерра, 2004. 424 с.

3. Уракова М.А. Метаболические функции и водный баланс легких при экспериментальном антифосфолипидном синдроме // Вестник Уральского медицинский академической науки, 2012. Т. 39, № 2. С. 66. [Urakova M.A. Metabolic activity and water balance of lung in experimental antiphospholipid syndrome. *Vestnik Uralskoy meditsinkoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic*, 2012, Vol. 39, no. 2, p. 66. (In Russ.)]

4. Уракова М.А., Брындина И.Г. Метаболическая активность и водный баланс легких при моделировании аутоиммунной патологии у крыс // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология, 2013. № 29. С. 272-276. [Urakova M.A., Bryndina I.G. Metabolic activity and water balance of lungs in modeling of autoimmune pathology in rats. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya i ekologiya = Bulletin of Tver State University. Series: Biology and ecology*, 2013, no. 29, pp. 272-276. (In Russ.)]

5. Уракова М.А., Брындина И.Г. Влияние финголимода на сурфактант и гемостаз-регулирующую активность легких при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите // Патогенез, 2020. Т. 18, № 4. С. 43-48. [Urakova M.A., Bryndina I.G., The influence of fingolimod on surfactant and hemostasis-regulating activity of the lung in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Patogenez = Pathogenesis*, 2020, Vol. 18, no. 4, pp. 43-48. (In Russ.)]

6. Al-Saedy M., Tarokh A., Nelson S., Hossini K., Green F., Ling Ch.-Ch. The role of multilayers in preventing the premature buck-ling of the pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2017, Vol. 1859, no. 8, pp. 1372-1380.

7. Chaudhry B.Z., Cohen J.A., Conway D.S. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators for the treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*, 2017, Vol. 14, no. 4, pp. 859-873.

8. Chen Z., Zhong M., Luo Y. Determination of rheology and surface tension of airway surface liquid: a review of clinical relevance and measurement techniques. *Respir. Res.*, 2019, Vol. 20, no. 1, 274. doi: 10.1186/s12931-019-1229-1.

9. Kitamura Y., Nomura M., Shima H. Acute lung injury associated with systemic inflammatory response syndrome following subarachnoid. *Neurol. Med. Chir.*, 2010., Vol. 50, pp. 456-460.

10. Nomura H., Hirashima Y., Endo S. Anticardiolipin antibody aggravates cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits. *Stroke*, 1998, Vol. 29, no. 5, pp. 1014-1018.

11. Scaccabarozzi D., Deroost K., Lays N., Salè F.O., van den Steen, Taramelli D. Altered lipid composition of surfactant and lung tissue in murine experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 12, e0143195. doi: 10.1371/journal.pone.0143195.

Авторы:

Уракова М.А. — д.м.н., доцент кафедры патологической физиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

Мустаев В.Р. — студент 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

Каримова Г.Р. — студентка 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

Authors:

Urakova M.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathological Physiology and Immunology, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

Mustaev V.R., 3rd year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

Karimova G.R., 3rd year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

Кузнецова М.Г. — студентка 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

Рахматуллина Э.Н. — студентка 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

Оленева С.А. — студентка 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

Уракова К.В. — студентка 1-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

Kuznetsova M.G., 3rd year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

Rakhmatullina E.N., 3rd year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

Oleneva S.A., 3rd year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

Urakova K.V., 1st year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

Поступила 30.03.2024

Отправлена на доработку 01.04.2024

Принята к печати 05.04.2024

Received 30.03.2024

Revision received 01.04.2024

Accepted 05.04.2024