

УДК 615.099.092

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕРФТОРИЗОБУТИЛЕНА НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ СУРФАКТАНТА *in vitro*

© 2019 г. П. Г. Толкач^{1, *}, В. А. Башарин¹, С. В. Чепур^{2, **},
А. С. Никифоров², Д. В. Цой²

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

²Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: pgtolkach@gmail.com

**e-mail: gniiivm_2@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2019 г.

После доработки 08.04.2019 г.

Принята к публикации 23.05.2019 г.

Легочный сурфактант – липопротеидный комплекс, состоящий на 70–75% из фосфолипидов. Перфторизобутилен – высокотоксичный газ, образующийся как вторичный продукт фторполимерной продукции, интоксикация которым приводит к развитию острой воспалительной реакции в легких. Воспаление может быть опосредовано высвобождением провоспалительных медиаторов (арахидоновая кислота, лизофосфатидилхолин) в результате разрушения фосфолипидов сурфактанта при ингаляционном воздействии токсичных веществ, в том числе перфторизобутилена. При хроматомасспектрометрии образцов сурфактанта (Сурфактант ВЛ (ООО Биосурф, Россия)) *in vitro* проведено количественное определение продуктов деструкции фосфолипидов после воздействия перфторизобутилена. Было показано дозозависимое снижение содержания основных фосфолипидов сурфактанта (дипальмитоилфосфатидилхолина (C₄₀H₈₀NO₈P, Mг – 734.5) и ненасыщенного фосфатидилхолина (C₄₂H₈₂NO₈P, Mг – 760.5)) при отсутствии арахидоновой кислоты и лизофосфатидилхолина. Результаты экспериментов не подтвердили роль легочного сурфактанта в формировании воспалительного процесса в легких после интоксикации перфторизобутиленом и послужили аргументами в пользу клеточной гипотезы формирования токсического отека легких.

Ключевые слова: перфторизобутилен, сурфактант, фосфотидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, воспаление, высокоэффективная жидкостная хроматография

DOI: 10.1134/S0042132419050090

ВВЕДЕНИЕ

Фторолефины относят к алкенам, в которых один или несколько атомов водорода замещены фтором (в перфтор-*n*-алкенах все атомы водорода замещены на фтор). По сравнению с водородсодержащими аналогами фторолефины термостабильны, нерастворимы в органических растворителях, устойчивы к химическим воздействиям, обладают прекрасными диэлектрическими свойствами (Паншин и др., 1978). Данные качества обуславливают их широкое применение в виде фторполимеров в химической промышленности, электротехнике, машиностроении, медицине, пищевой промышленности и др. (Tsai, 2009).

Фторполимеры малотоксичны, однако, при их нагревании более чем на 400°C образуются высокотоксичные соединения, наиболее опасное из которых – перфторизобутилен (ПФИБ) (Tsai, 2009). Им, в первую очередь, обусловлена токсич-

ность продуктов пиролиза политетрафторэтилена для человека (Паншин и др., 1978).

Перфторизобутилен обладает высокой электрофильной активностью и реагирует практически со всеми известными нуклеофилами, что имеет большое значение для химии фторорганических соединений. Он находит широкое применение в лабораторном синтезе для получения функциональных фторорганических соединений многих типов: гексафторацетон (производство лекарств и пестицидов), бис(трифторметил)кетен (модификация свойств шерстяных тканей) и др. (Зейфман и др., 1984).

В Российской Федерации объем производства фторполимерной продукции составляет десятки тысяч тонн в год. Мощности по выпуску фторполимерного сырья в РФ ежегодно увеличивается на 5–10%. Помимо этого, в РФ функционирует около 40 предприятий по переработке отходов

производства фторполимеров, в частности, методом термического разложения до газообразных продуктов.

Интоксикация ПФИБ может произойти при возникновении аварийных ситуаций или при нарушении правил техники безопасности на объектах производства фторполимерной продукции или их переработки.

Перфторизобутилен – высокотоксичный газ, поступает в организм ингаляционным путем и приводит к развитию острого поражения легких, вплоть до токсического отека легких. На текущий момент механизм токсического действия ПФИБ окончательно не изучен. Считается, что этот газ воздействует на компоненты аэрогематического барьера (АГБ), что приводит к запуску острой воспалительной реакции и увеличению проницаемости АГБ (Zhang et al., 2017). Однако окончательно не установлено, какой компонент АГБ представляет собой первичную мишень для ПФИБ, воздействие на которую может приводить к выбросу провоспалительных агентов и запуску каскада воспалительных реакций.

Аэрогематический барьер млекопитающих представлен слоем сурфактанта, альвеолоцитов, выстилающих полость альвеолы, базальной мембраной и слоем эндотелиоцитов, выстилающих полость сосуда (Histology for ..., 2007). Первый барьер на пути поступления ПФИБ представлен слоем сурфактанта. Легочный сурфактант представляет собой липопротеидный комплекс, покрывающий поверхность альвеолярного эпителия и располагающийся на границе раздела фаз. Основная функция легочного сурфактанта состоит в снижении поверхностного натяжения на границе воздух–вода с 72 мН/м до 20–25 мН/м (Розенберг, 2014). Большую часть легочного сурфактанта составляют фосфолипиды (ФЛ) с поверхностно-активными свойствами. На границе раздела двух фаз (воздух–вода) фосфолипиды формируют монослой, в котором их гидрофильная часть обращена в гипофазу, а гидрофобная – в воздух. Чем больше ФЛ в монослое, тем ниже поверхностное натяжение (Ерохин и др., 2013).

Основная доля ФЛ сурфактанта представлена фосфатидилхолином (70–75% от всех ФЛ). Фосфатидилхолин, в первую очередь, представлен его насыщенной формой, содержащей два остатка пальмитиновой кислоты, – дипальмитоилфосфатидилхолином (ДПФХ) (60–65% от всего фосфатидилхолина) (Розенберг, 2014). Помимо остатков пальмитиновой кислоты в составе фосфатидилхолинов могут быть другие ненасыщенные жирные кислоты, например арахидоновая кислота ($0.49 \pm 0.09\%$ от всех жирных кислот в его составе) (Schmidt et al., 2001). В результате воздействия фосфолипаз происходит разрушение сложной связи ФЛ между остатком жирной

кислоты и глицеролом с образованием соответствующей жирной кислоты и лизофосфатидилхолина (неактивный предшественник липидных провоспалительных медиаторов (фактор активации тромбоцитов)) (Ерохин и др., 2013). В результате метаболизма арахидоновой кислоты образуются различные провоспалительные медиаторы: лейкотриены, простаглицлины, простагландины, тромбоксаны, которые способны инициировать процесс воспаления (Оксидативный стресс ..., 2012). Таким образом, можно предположить, что вследствие разрушения ФЛ легочного сурфактанта под действием различных токсичных агентов могут образовываться провоспалительные медиаторы, инициирующие каскад воспалительных реакций в легких и приводящие к токсическому отеку.

Цель исследования состояла в количественном определении содержания лизофосфатидилхолина и арахидоновой кислоты в образцах сурфактанта после воздействия перфторизобутилена *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перфторизобутилен получали путем термодеструкции политетрафторэтилена при температуре 700–750°C в камере для пиролиза. Образовавшиеся продукты пиролиза, содержащие перфторизобутилен (далее продукты пиролиза), путем естественной конвекции поступали в ингаляционную камеру объемом 0.1 м³. Содержание ПФИБ в газовой смеси оценивали расчетным методом. Согласно данным литературы для крыс LC₅₀ ПФИБ при экспозиции 15 мин составляет 12 ± 2 ppm (Smith et al., 1982). При термическом разложении 2.68 ± 0.60 г политетрафторэтилена выявляли продукты пиролиза, ингаляционное воздействие которых в течение 15 мин приводило к гибели 50% лабораторных животных (крыс) в течение 24 ч после интоксикации (Толкач и др., 2018). С учетом того, что токсичность продуктов пиролиза политетрафторэтилена при нагревании более 475°C обусловлена в первую очередь ПФИБ (Паншин и др., 1978), в настоящем исследовании моделировали ингаляционное воздействие ПФИБ на сурфактант *in vitro* путем пиролиза эквивалентного количества политетрафторэтилена за аналогичное время.

Сурфактант VL (ООО Биосурф, Россия) массой 80 мг растворяли в 20.0 мл 0.9% NaCl, нагревом до 37.0°C. Полученную суспензию переливали в чашки Петри (4 пробы по 5 мл). Пробы № 2, 3 и 4 помещали поочередно в ингаляционную камеру. В течение 15 мин каждую пробу подвергали воздействию продуктов пиролиза, содержащих ПФИБ в концентрациях 12, 24 и 60 ppm, соответственно. Пробу № 1 (контроль) помещали в инга-

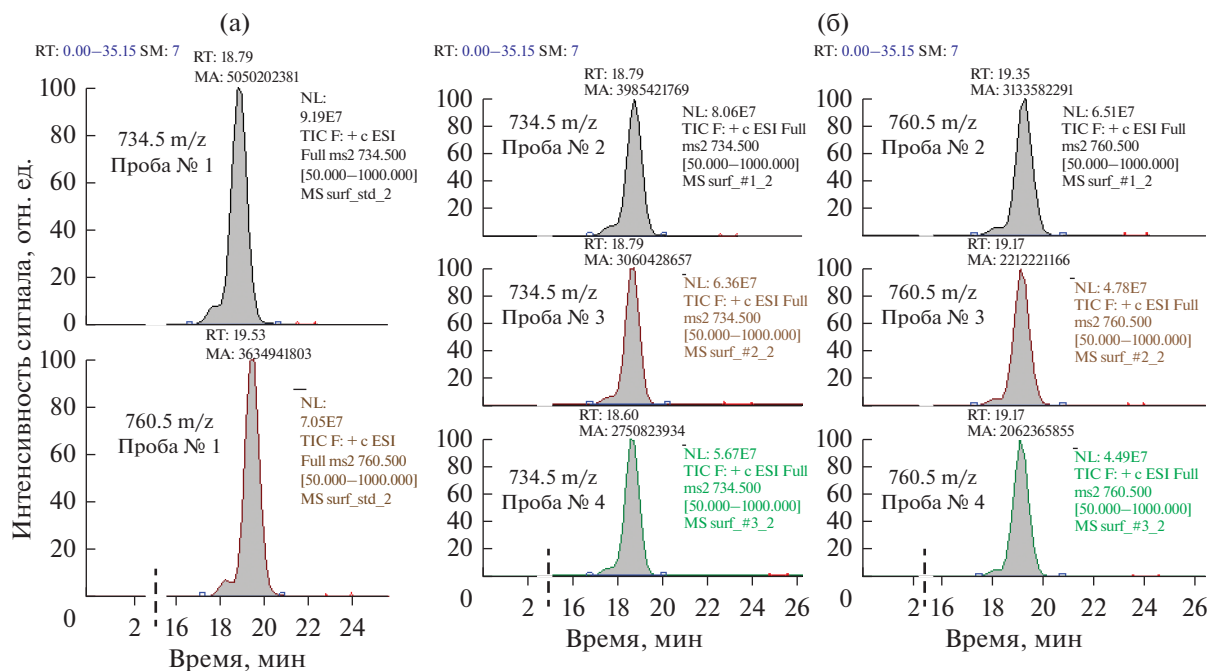


Рис. 1. Хроматограммы проб сурфактанта, RT = 18.79 мин, 19.53 мин, по выделенным ионам $m/z = 734.5$ и 760.5 . (а) — проба № 1 (контроль); (б) — пробы № 2, № 3, № 4 после воздействия ПФИБ в различных концентрациях.

ляционную камеру, где она находилась в атмосферном воздухе в течение 15 мин.

После окончания воздействия проводили идентификацию и количественное определение фосфолипидов, входящих в состав сурфактанта методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным тройным квадрупольным масс-детектированием (Thermo UltiMate 3000RS с масс-детектором TSQ Quantum Access Max). Хроматографический анализ выполняли при следующих условиях: колонка Hamilton PRP-3300 Å 150 × 2.1 мм 10 μм; подвижная фаза: А: 0.1% CF₃COOH в деионизованной воде; В: 0.1% CF₃COOH/10% H₂O/15% ACN в изопропанол; скорость потока: 0.4 мл/мин; температура термостата 35°C; объем ввода 15 μл. В качестве стандартного вещества использовали образец сурфактанта, растворенного в 0.9% NaCl. Анализ компонентов сурфактанта проводили в режиме Full Scan MS1 в диапазоне 50–1000 m/z с регистрацией положительных ионов. Подтверждение структуры идентифицированных соединений проводили с помощью тандемной масс-спектрометрии в режиме SIM product Full Scan путем разбиения родительского иона и регистрации его осколков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После разведения сурфактанта в физиологическом растворе получали гомогенную белесоватую суспензию (4 мг/мл), которую в чашке Петри по-

мещали в ингаляционную камеру и подвергали воздействию продуктов пиролиза. По окончании воздействия изменений внешнего вида в суспензии сурфактанта отмечено не было.

В результате проведения хроматографического анализа в пробах определяли соединения по выделенным ионам $m/z = 734.5$ и 760.5 , которые соответствовали дипальмитоилфосфатидилхолину (C₄₀H₈₀NO₈P) и ненасыщенному фосфатидилхолину (C₄₂H₈₂NO₈P), предположительно — 1-пальмитоил-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолину, соответственно (рис. 1а, рис. 2). Хроматограммы проб сурфактанта после воздействия ПФИБ (пробы № 2, 3, 4) по выделенным ионам $734.5 m/z$ и $760.5 m/z$ приведены на рисунке 1б. На основании полученных данных были рассчитаны концентрации дипальмитоилфосфатидилхолина и ненасыщенного фосфатидилхолина (C₄₂H₈₂NO₈P) в исследуемых пробах сурфактанта после воздействия перфторизобутилена (таблица).

Отмечено снижение содержания основных фосфолипидов в пробах сурфактанта *in vitro* после воздействия продуктов пиролиза (таблица). Так, при увеличении концентрации в ингаляционной камере ПФИБ регистрировали снижение содержания ДПФХ и ненасыщенного фосфатидилхолина почти в 2 раза по сравнению с контролем. Таким образом, отмечали дозозависимое снижение основных фосфолипидов сурфактанта после воздействия ПФИБ. Соединений из группы лизофосфатидилхолинов (Mг — 433.55–567.69)

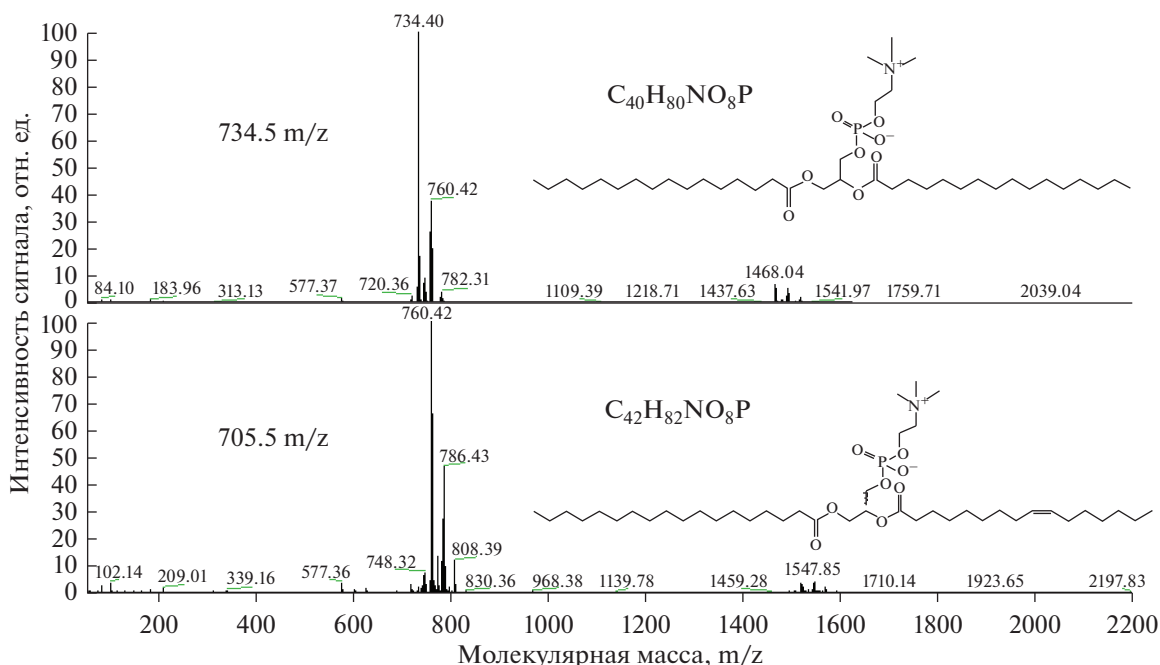


Рис. 2. Масс-спектр стандартного образца сурфактанта, RT = 18.79 мин, 19.53 мин. Определяется дипальмитоилфосфатидилхолин ($C_{40}H_{80}NO_8P$), ненасыщенный фосфатидилхолин ($C_{42}H_{82}NO_8P$).

(Suárez-García et al., 2017) и арахидоновой кислоты ($M_r = 304.4$) во всех пробах обнаружено не было.

Токсичность продуктов пиролиза фторполимеров в первую очередь обусловлена перфторизобутиленом (Tsai, 2009). В настоящее время специфических средств терапии отравления этим токсикантом не разработано. Вероятно, это связано с отсутствием четкого понимания механизма токсического действия ПФИБ. Согласно данным литературы, ПФИБ, поступая в организм ингаляционным путем, приводит к активации воспалительного каскада и развитию токсического отека легких (Zhang et al., 2017). Однако во многих научных работах не дифференцируется первичная точка приложения ПФИБ, указывается на то, что он воздействует на все компоненты АГБ (Meng et al., 2011; Zhang et al., 2017).

Перфторизобутилен обладает высокой электрофильной активностью, что позволяет ему легко вступать в реакции со всеми известными нук-

леофилами. Высокая электрофильность обусловлена сочетанием сильного электроноакцепторного действия атомов фтора и групп CF_3 . Взаимодействуя с нуклеофилами, ПФИБ вступает с ними в реакции нуклеофильного присоединения и/или замещения, что приводит к образованию соответствующих аддуктов (Зейфман и др., 1984).

В легочном сурфактанте наибольшее количество нуклеофильных групп представлено в ДПФХ. Возможный механизм взаимодействия ПФИБ с ДПФХ приведен на рис. 3. Перфторизобутилен, вероятнее всего, будет вступать в реакцию нуклеофильного присоединения с группой $-O^-$ остатка фосфорной кислоты. В результате данной реакции может образовываться аддукт ПФИБ и ДПФХ с $M_r = 915.13$ и ион фтора (F^-) (рис. 3). В химии перфторизобутилена не описаны реакции, которые могут привести к разрушению сложноэфирной связи между остатком жирной кислоты и глицеролом с образованием соответствующей жир-

Таблица. Количественное содержание фосфолипидов в образцах суспензии сурфактанта после воздействия продуктов пиролиза, мг/мл

№ пробы/концентрация ПФИБ	Дипальмитоилфосфатидилхолин ($C_{40}H_{80}NO_8P$)	Ненасыщенный фосфатидилхолин ($C_{42}H_{82}NO_8P$)
№ 1 (контроль)	1.60	1.00
№ 2 (12 ppm, 15 мин)	1.26	0.86
№ 3 (24 ppm, 15 мин)	0.97	0.61
№ 4 (60 ppm, 15 мин)	0.87	0.57

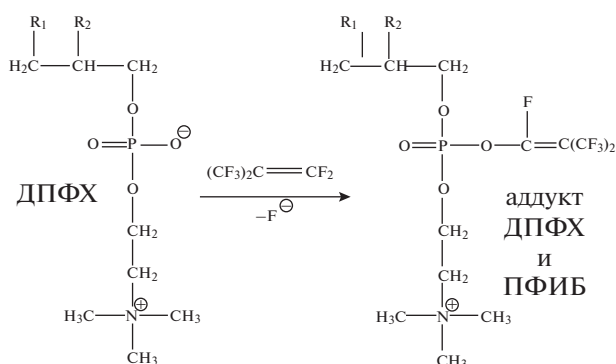


Рис. 3. Возможный механизм взаимодействия перфторизобутилена и дипальмитоилфосфатидилхолина. R_1 и R_2 – остатки пальмитиновой кислоты.

ной кислоты (пальмитиновой – при разрушении ДПФХ, арахидоновой – при разрушении соответствующих ФЛ) и лизофосфатидилхолина (Зейфман и др., 1984).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном экспериментальном исследовании было установлено, что воздействие ПФИБ на суспензию сурфактанта *in vitro* приводило к дозозависимому снижению содержания основных фосфолипидов легочного сурфактанта. Однако во всех пробах не идентифицировали соединений соответствующих аддуктам ДПФХ и ПФИБ. Вероятно, снижение содержание ДПФХ обусловлено опосредованным воздействием ПФИБ. Более того, не было обнаружено провоспалительных медиаторов (арахидоновой кислоты и лизофосфатидилхолина), которые могут образовываться при разрушении ФЛ под воздействием ПФИБ.

Таким образом, можно предположить, что воспалительный процесс, развивающийся в легких после интоксикации ПФИБ, не может быть инициирован провоспалительными агентами, образующимися при разрушении ФЛ легочного сурфактанта вследствие их непосредственного взаимодействия с токсикантом. Другими источниками провоспалительных медиаторов, образующихся в результате воздействия на сурфактант, могут быть специфические белки (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D). Исследование данных патогенетических механизмов поражения легких при воздействии ПФИБ требует проведения дальнейших экспериментальных исследований. Накопленные сведения усиливают аргументы в пользу участия факторов нарушенного метаболизма альвеолоцитов в формировании токсического отека легких и поддерживают клеточную теорию формирования токсического отека легких.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ерохин В.В., Лепеха Л.Н., Ерохина М.В., Ловачева О.В. Сурфактантная система при туберкулезе легких. М.: ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН, 2013. 265 с.
- Зейфман Ю.В., Тер-Габриэлян Е.Г., Гамбарян Н.П., Кнунянц И.Л. Химия перфторизобутилена // Успехи химии. 1984. Т. 53. № 3. С. 431–452.
- Оксидативный стресс и воспаление: патогенетическое партнерство: монография / Ред. О.Г. Хурцилава, Н.Н. Плужников, Я.А. Накатис. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2012. 340 с.
- Панишин Ю.А., Малкевич С.Г., Дунаевская Ц.С. Фторопласты. Л.: Химия, 1978. 232 с.
- Розенберг О.А. Препараты легочного сурфактанта при острых и хронических заболеваниях легких (Часть I) // Общая реаниматология. 2014. Т. 10. № 3. С. 51–73.
- Толкач П.Г., Башарин В.А., Чепур С.В. Токсический отек легких у лабораторных животных при ингаляции продуктов пиролиза политетрафторэтилена // Мед. биол. и соц. психол. пробл. безопасн. в чрезв. ситуациях. 2018. Т. 2. С. 80–85.
- Histology for pathologists, 3rd ed. / Ed. S.E. Mills. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. P. 547–562.
- Meng G., Zhao J., Wang H. et al. Injury of cell tight junctions and changes of actin level in acute lung injury caused by the perfluoroisobutylene exposure and the role of myosin light chain kinase // J. Occup. Health. 2011. V. 53. P. 250–257.
- Schmidt R., Meier U, Yabut-Perez M. et al. Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. V. 163. P. 95–100.
- Smith L.W., Gardner R.J., Kennedy G. Jr. Short-term inhalation toxicity of perfluoroisobutylene // Drug Chem. Toxicol. 1982. V. 5. № 3. P. 295–303.
- Suárez-García S., Arola L., Pascual-Serrano A. et al. Development and validation of a UHPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of mammalian lysophosphatidylcholines and lysophosphatidylethanolamines in serum // J. Chromatography. 2017. V. 1055–1056. P. 86–97.
- Tsai W.T. Environmental hazards and health risk of common liquid perfluoro-n-alkanes, potent greenhouse gases // Environ. Internat. 2009. V. 35. P. 418–424.
- Zhang Y, Fan L., Xi R. et al. Lethal concentration of perfluoroisobutylene induced acute lung injury in mice mediated via cytokine storm, oxidative stress and apoptosis // Inhal. Toxicol. 2017. V. 29. № 6. P. 255–265.

Exploration of Influence of Perfluoroisobutylene on the Surfactant Lipid Composition *in vitro*

P. G. Tolkach^{a, *}, V. A. Basharin^a, S. V. Chepur^{b, **}, A. S. Nikiforov^b, D. V. Tsoy^b

^aKirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

^bState Scientific-Research Test Institute of the Military Medicine, Russian Federation Defense Ministry, Saint-Petersburg, Russia

*e-mail: pgtolkach@gmail.com

**e-mail: gniivm_2@mail.ru

Received March 28, 2019

Revised April 8, 2019

Accepted May 23, 2019

Pulmonary surfactant is a lipoprotein complex consisting of 70–75% phospholipids. Perfluoroisobutylene is a highly toxic gas which was formed as a product of the fluoropolymer industry. Acute perfluoroisobutylene intoxication leads to the development of acute lung injury. The inflammation may be initiated by pro-inflammatory mediators (arachidonic acid, lysophosphatidylcholine) as a result of inhalation of toxic substances, e.g. perfluoroisobutylene. Using phospholipid quantitative chromatomassspectrometria the surfactant degradation products after perfluoroisobutylene exposure *in vitro* were determined. A dose-dependent decrease of the main surfactant phospholipids was shown (dipalmitoylphosphatidylcholine (C₄₀H₈₀NO₈P, Mr – 734.5) and unsaturated phosphatidylcholine (C₄₂H₈₂NO₈P, Mr – 760.5)) without arachidonic acid and lysophosphatidylcholine were observed. The experiments data cannot be assumed as a key role of surfactant in the lung inflammatory formation after perfluoroisobutylene intoxication and became the arguments to cell hypotheses of toxic edema formation.

Keywords: perfluoroisobutylene, surfactant, phosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, inflammation, high performance liquid chromatography