

**КАЧЕСТВЕН И ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕН АНАЛИЗ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА  
МАСТНИ КИСЕЛИНИ ЧРЕЗ ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ С МАССЕЛЕКТИВЕН  
ДЕТЕКТОР  
В ГАСТРАЛНИ АСПИРАТИ ОТ НОВОРОДЕНИ ДЕЦА**

**Мая Бангъозова<sup>1</sup>, Албена Йорданова<sup>2</sup>, Ася Цанова<sup>3</sup>, Емилия Христова<sup>4</sup>,  
Йордан Думанов<sup>1</sup>, Здравко Лалчев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Катедра „Биохимия”, Биологически факултет, Софийски университет „Св. Кл. Охридски”, София*

<sup>2</sup> *Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН, София*

<sup>3</sup> *Катедра „Химия, биохимия, физиология и патофизиология”, Медицински факултет, Софийски университет „Св. Кл. Охридски”, София*

<sup>4</sup> *Факултет по обществено здраве, Медицински университет, София*

**QUALITATIVE AND SEMI-QUANTITATIVE ANALYSIS OF FATTY ACIDS IN  
GASTRIC ASPIRATE SAMPLES BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SELECTIVE  
DETECTOR**

**Maya Bangyozova<sup>1</sup>, Albena Jordanova<sup>2</sup>, Asya Tsanova<sup>3</sup>, Jordan Doumanov<sup>1</sup>, Emilia  
Christova<sup>4</sup>, Zdravko Lalchev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Faculty of Biology, St. Kl. Ohridski University of Sofia, Sofia, Bulgaria*

<sup>2</sup> *Institute of Biophysics and biomedical engineering, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria; albena@biofac.uni-sofia.bg*

<sup>3</sup> *Faculty of Medicine, St. Kl. Ohridski University of Sofia, Sofia, Bulgaria*

<sup>4</sup> *Faculty of Public Health, Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria*

**ABSTRACT**

Phospholipids in the composition of alveolar surfactant play a crucial role for its optimal functioning. Studies on fatty acid composition of individual phospholipid components of alveolar surfactant show that there is some correlation between the fatty acid profile and normal biophysical function of alveolar surfactant. So far the fatty acid profile has been determined in alveolar surfactant only. For the first time in the present study fatty acid analysis of lipids in gastric aspirates from children with Neonatal Respiratory Distress Syndrome (NRDS), premature infants and full-term babies was made. Qualitative and semi-quantitative analysis of fatty acids in gastric aspirate samples was made by Gas Chromatography-Mass Selective Detector. The results show that saturated/unsaturated fatty acids ratio is highest in the group of full-term infants. Moreover, the most common of all fatty acids is the saturated palmitic (C16:0). Based on these and future studies we expect a new method based on analyses of gastric aspirates for determining lung maturity to be established which could be useful for the clinical practice in the NRDS therapy of children.

**Keywords:** *Neonatal Respiratory Distress Syndrome, Gas Chromatography-Mass Selective Detector, Fatty acids*

**УВОД**

Алвеоларният сурфактант (АС) представлява сложен липид-белтъчен комплекс, покриващ алвеолите, който се секретира от специализирани епителни клетки в белия дроб – пневмоцити тип II. Липсата на зрял АС или неговата инактивация и/или дисфункция води до развитието на респираторен дистрес синдром (РДС) - заболяване, което често има летален изход. Инхибирането на АС може да се предизвика от плазмени белтъци (главно албумин), простагландини, адхезионни молекули, кръвни компоненти и възпалителни медиатори (които в норма не присъстват на алвеоларната повърхност) в резултат на травма, сепсис,

масивен кръвоизлив, изтичане на стомашни сокове в белия дроб и др. [1]. За лечение на РДС през последните десетилетия в клиничната практика успешно се прилагат естествени и изкуствени екзогенни сърфактантни препарати, които се явяват аналози на човешкия АС.

Алвеоларният сърфактант се състои главно от липиди - (около 80%), известно количество въглехидрати и около 10% специфични белтъци [2]. Морфологично и функционално АС е хетерогенен, тъй като в състава му влизат разнообразни компоненти, които формират различни моно-, би- и мултислойни структури на граничната повърхност в белия дроб [3,4]. Въпреки че специфичните сърфактантни белтъци са изключително важни за осъществяване на функциите на АС, именно липидите са отговорни за достигане и поддържане на ниски стойности на повърхностното напрежение при издишване. Прави впечатление, че АС изолиран от различни видове бозайници, показва голямо сходство в липидния състав [5,6]. Анализът му показва наличието на необичайни и характерни за АС липидни компоненти - преобладават фосфолипидите (ФЛ), от които най-висок процент (72-80%) се пада на фосфатидилхолин, следван от фосфатидилглицерол (8-12%). Фосфолипиди като фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламин и сфингомиелин, които са главни компоненти на клетъчните мембрани, при алвеоларния сърфактант се срещат в по-малки количества [7,8]. Етерните липиди като 1-0-(1'-алкенил)-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин представляват около 4% от състава на АС [5]. Неутралните липиди съставляват 7-10% от липидите в АС, като сред тях на холестерола се падат 80-90% [6]. При повечето бозайници са установени и малки количества моно- би- и триацилглицероли, както и свободни мастни киселини, основно палмитинова киселина.

Вида на отделните фосфолипиди в белодробния алвеоларен сърфактант, както и тяхното съотношение, имат изключително важна роля за неговото оптимално функциониране [4, 9-12]. Изследванията върху мастно-киселинния (МК) състав на отделните фосфолипидни компоненти на АС показват, че има корелация между мастно-киселинния профил и нормалната функция на сърфактанта. В научната литература до сега има данни за определяне на МК профил само в алвеоларен сърфактант.

В настоящата работа посредством газова хроматография с маселективен детектор за първи път е направен сравнителен мастно-киселинен анализ на липиди в гастрални аспирати (ГА) от доносени деца, недоносени новородени и деца с неонатален РДС (НРДС), с цел търсене на корелация между белодробната зрялост на децата и мастно-киселинния профил в гастралните им аспирати.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

**Начин на подготовка на пробата:** Използвани са метилови естери на мастните киселини, получени по процедурата описана от W.W.Christie [13]. Приложената процедура е с малки модификации и е направена с любезното съдействие на Съвместен геномен център, гр. София.

Проба ГА с обем 1.5 ml се прехвърля в стъкло петри и се лиофилизира в продължение на 12 h, чрез лиофилизатор „Christ Alpha 1-2 D plus“. Следва двукратна екстракция с разтворител хлороформ-метанол (2:1). Екстрактът се прехвърля в епруветка и се концентрира, след което се подлага на киселинна хидролиза за 12 h на водна баня при температура 50°C. След протичане на реакцията към пробата се добавят 5 ml 5% NaCl. С помощта на делителна фуния пробата се екстрахира двукратно с по 5 ml хексан. Събраните хексанови екстракти се промиват с 2% NaHCO<sub>3</sub>. Промитият екстракт се прехвърля в епруветка и разтворителя в пробата се изпарява с помощта на ротационен вакуум изпарител „Christ Alpha RVC 2-25CD plus“. Пробата се разтваря в 500 µl хексан.

**Количествен и полуколичествен мастно-киселинен анализ посредством газова хроматография с маселективен детектор:** Използвана е апаратура GC 7890A MS 7000A QQQ Agilent Technologies, USA, работеща с колона „HP Innowax“ (30m, 250 µm x 250 µm).

Газ носител е хелий с постоянен поток 0.8 ml/min. Обемът на пробата е 1 µl. Анализът се извършва при температура на инжектора 260°C. Използваната температурна програма протича по следната схема: началната температура е 150°C без задържане и градиент 4°C/min до достигане на 250°C. Следва задържане на 250°C в продължение на 25 min. Общото време за анализ на една проба е 45 min.

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

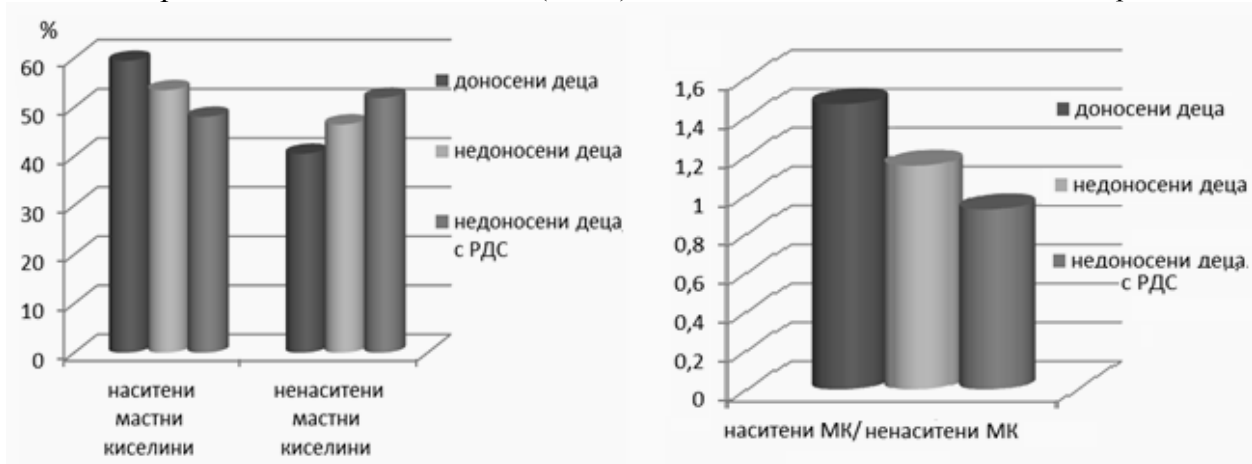
Известно е, че алвеоларните сурфактантни фосфолипиди включват необичайно висок процент двойнонаситени видове, сред които най-застъпен е дипалмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) - 32-40% [7,14], което представлява уникално високо съдържание, в сравнение с това при биологичните мембрани. Смята се, че ДПФХ е основният повърхностно активен компонент на АС [15]. Той е представен в достатъчно количество, за да образува *in vivo* непрекъснат екстрацелуларен слой върху цялата алвеоларна повърхност. Отговорен е също за постигането на ниските стойности на повърхностното напрежение при издишване. Неразтворими монослоеве от ДПФХ, изследвани *in vitro*, са в състояние да достигнат повърхностно напрежение под 5 mN/m при компресия на въздушно-водната фазова граница [16]. Тези слоеве са изключително стабилни и релаксират до равновесно повърхностно напрежение в продължение на няколко часа. Едновременно с това обаче, ДПФХ се адсорбира изключително бавно от субфазата и показва много лош динамичен респрединг, когато компресията на слоевете се извършва в режим на колапс [17]. Молекули на ДПФХ, напуснали веднъж повърхностния монослой при ниско повърхностно напрежение, не могат да се върнат обратно в него и повече не участват в понижаването на повърхностното напрежение [18]. От тази гледна точка ДПФХ не е достатъчен за осъществяването на оптималните функции на АС. Кинетичните свойства на АС изискват наличие на други липиди и специфични хидрофобни белтъци, които да увеличат флуидитета при телесна температура, тъй като температурата на фазовия преход от гелно в течно-кристално състояние за ДПФХ е 41°C [19]. Ненаситените ФХ и другите фосфолипидни компоненти вероятно играят важна роля в този процес [20].

До сега мастно-киселинният профил на липидите в АС е определян в проби трахеални аспирати и резултатите показват, че оптималният мастно-киселинен профил влияе на нормалното функциониране на белия дроб. В научната литература е доказано, че в АС наситените мастни киселини са в по-голямо количество, в сравнение с ненаситените. От тях очаквано преобладава наситената палмитиновата киселина (C16:0) – компонент на ДПФХ, като количеството ѝ нараства с увеличаването на гестационната седмица при всички анализирани фосфолипиди. Друга мастна киселина, която се среща в значително количество, е стеариновата киселина (C18:0). До този момент не са публикувани данни за високи концентрации на миристинова киселина (C14:0) в АС. При бебета с хиалинно-мембранна или интерстициална болест се наблюдава значително по-ниско съдържание на палмитинова киселина (C16:0), в сравнение със здрави бебета [21-23]. Трябва да се отбележи, че в научната литература има данни за определяне на мастно-киселинния профил, както и промени в количеството МК при респираторни патологии, само в бронхо-алвеоларен лаваж, като резултатите са съотнесени за отделните фосфолипидни компоненти [22].

В представената работа за първи път е направен мастно-киселинен анализ на липиди в гастрални аспирати от доносени здрави, недоносени здрави и недоносени деца с НРДС. Резултатите от газовата хроматография показват, че се наблюдава по-високо съдържание на наситени мастни киселини при всички изследвани проби ГА, в сравнение с ненаситените мастни киселини (Фиг.1). Тази тенденция е в съответствие с количеството на наситените и ненаситените МК респ. през ембрионалното развитие, установени в алвеоларния сурфактант, получен след бронхо-алвеоларен лаваж. Вижда се, че процентното съдържание на наситените МК в ГА от здрави, доносени деца доближава 60%, докато при недоносените

здравите новородени количеството е по-ниско – 51%, а при страдащите от НРДС е около 45%. В допълнение, съотношението между наситените и ненаситените МК в трите групи изследвани деца показва, че то е най-високо в групата на здравите доносни деца (1,4), като това съотношение намалява при здравите недоносни (1,05), и достига най-ниска стойност от 0,85 при недоносените с НРДС (Фигура 2).

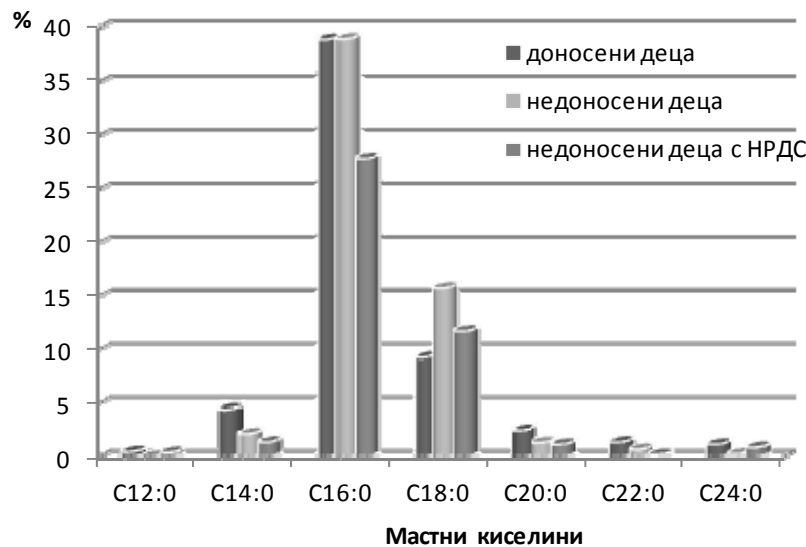
Масно-киселинният профил на наситените МК в ГА от трите тествани групи деца е представен на Фигура 3. Вижда се, че лауриновата киселина (C12:0) не се открива при недоносените деца с НРДС, докато при здрави недоносни и доносни деца се откриват следови количества от нея. Миристиновата киселина (C14:0) също се открива в малки количества, като се наблюдава незначително повишение с напредване на ембрионалното развитие. Най-високо съдържание при здравите доносни новородени очаквано се наблюдава при палмитиновата киселина (C16:0) – до около 40% от totalното МК съдържание.



**Фигура 1.** Процентно съдържание на наситени и ненаситени мастни киселини в проби ГА от доносни, недоносни здрави и недосени деца с РДС.

**Фигура 2.** Съотношение между процентното съдържание на наситени и ненаситени мастни киселини в проби ГА от доносни, недоносни здрави и недосени деца с РДС.

Тази стойност е значително по-ниска от определената в алвеоларен сурфактант при здрави хора – до 80% [23]. Това понижено съдържание на C16:0 може да бъде обяснено с наличието в гастралните аспирати не само на белодробен лаваж, но и на амниотична течност, секрети от храносмилателния тракт, мекониум и др. Резултатите за стеариновата киселина (C18:0) на този етап от изследването показват, че по-високи нива се детектират в недоносените деца с НРДС, но литературни данни показват, че не се наблюдават съществени разлики в концентрацията на C18:0 при здрави доносни и при страдащи от НРДС деца [22]. Известно е, че арахидиновата (C20:0), бехеновата (C22:0) и лигноцериновата (C24:0) МК се откриват в минорни количества в АС [23]. Резултатите от нашето изследване също показват незначителни количества от тези дълговерижни наситени МК в пробите гастрални аспирати. Като обобщение, може да се заключи, че съдържанието на наситените мастни киселини с различна въглеродна верига при патология е по-ниско спрямо нормата, което би могло да обясни и нарушаването на биологичната функция на АС, поради промяната в състава и понижената концентрация на алвеоларните фосфолипиди, едно от последствията на което е развитието на НРДС.



**Фигура 3.** Процентно съдържание на наситени мастни киселини в проби от доносни, недоносни и недоносни деца с НРДС.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощта на газова хроматография с маселективен детектор е направен качествен и полуколичествен мастно-киселинен анализ на съдържащите се в гастралните аспирати липиди. Резултатите показват, че съотношението наситени/ненаситени мастни киселини е най-високо при здравите доносни деца, което съответства на белодробната им зрялост. В допълнение, от мастните киселини в най-големи количества се открива характерната за алвеоларния сърфактант палмитинова (C16:0) мастна киселина. Въз основа на тези и бъдещи изследвания очакваме да бъде създаден бърз и удобен метод на базата на гастрални аспирати, който да констатира белодробна незрялост и/или инактивация на АС при новородени деца, с оглед на своевременна терапия с използваните в клиничната практика животоспасяващи сърфактантни препарати.

**Благодарности:** Изследванията са финансирани по проект D002-107/08 и проект ДДВУ 02/10 към Българското Министерство на образованието, младежта и науката.

### ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

- Lewis JF, A Brackenbury, Crit Care Med, 31, 324-328, 2003.
- Creuwels LA, LM van Golde, HP Haagsman, Lung, 175, 1-39, 1997.
- Magoon M, JR Wright. A Baritussio, MC Williams, J Goerke, BBA, 750, 18-31, 1983.
- Лалчев З., Е. Христова, Алвеоларен сърфактант и неонатален респираторен дистрес синдром – от белодробната физиология до съвременно високотехнологично лечение, Университетско издание “Св. Климент Охридски” София, 2010.
- Rana FR, JS Harwood, AJ Mautonc, RA Dluhy, Biochemistiy, 32, 27-31, 1993.
- Veldhuizen R, K Nag, S Orgeig, F Possmayer, BBA, 1408, 90-108, 1998.
- Frosolono MF, BL Charms, R Pawlowski, S Slivka, J Lipid Res, 11, 439-457, 1977.
- Kuroki Y, DR Voelker, J Biol Chem, 269, 25943-25946, 1994.
- Scarpelli EM, E David, M Cordova, AJ Mautone, Am J Perinatol, 9, 414-419, 1992.
- Seeger W, A Günther, HD Walmrath, F Grimminger, HG Lasch, The Clinical investigator, 71:3, 177-190, 1993.
- Lalchev ZI, In: Handbook of surface and colloid chemistry (KS Birdi Ed.), CRC Press: Boca Raton New York London Tokyo, 625-687, 1997

12. Lalchev Z, R Todorov, D Exerowa, *Curr Opin in Colloid Interface Sci* 13: 183-193, 2008.
13. Christie W, *Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide*, Chapter 4, P.J. Barnes & Associates (The Oily Press Ltd), 36-47, 1989.
14. Rooney SA, *Environmental Health Perspectives*, 55, 205-226, 1984.
15. Notter R, S Tabak, R Mavis, *J Lipid Res*, 21, 10-22, 1980.
16. Zuo Y, F Possmayer, *J Appl Physiol*, 102, 1733-1734, 2007.
17. Chu J, J Clements, E Cotton, M Klaus, A Sweet, W Tooley, *Pediatrics*, 70, 709, 1967.
18. Wang Z, S Hall, R Notter, *J Lipid Res*, 36, 1283-1293, 1995.
19. Johansson J, T Curstedt, *Eur J Biochem*, 244, 675-693, 1997.
20. Veldhuizen EJ, Haagsman HP, *BBA* 1467:2, 255-70, 2000.
21. Parkinson CE, DR Harvey, J Pryse-Davies, *Pediatr Res Jun*, 11:6, 723-727, 1977.
22. Schmidt R, U Meier, MY Perez, D Walmrath, F Grimminger, W Seeger, A Gunther, *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 1, 95-100, 2001.
23. Schmidt R, U Meier, P Markart, F Grimminger, HG Velcovsky, H Moor, W Seeger, A Gunther, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283:L1079-L1085, 2002.