

Н.Н. Васильева, И.Г. Брындына, С.В. Протасова, Е.Г. Бутолин

Сурфактантная система легких при аллоксановом диабете у крыс с различной устойчивостью к стрессу

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, 426034, г.Ижевск, ул. Коммунаров, 281

При экспериментальном сахарном диабете наблюдается понижение поверхностно-активных свойств легких на фоне повышения содержания лизофосфолипидов легочного сурфактанта. Изменения сурфактантной системы легких коррелируют с уровнем глюкозы, гликозилированного гемоглобина и 11-ОКС в крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что степень нарушений в системе легочного сурфактанта при аллоксановом диабете зависит от устойчивости или предрасположенности животных к стрессу.

Ключевые слова: легочный сурфактант, аллоксановый диабет, индивидуальная стресс-устойчивость

N.N. Vasiljeva, I.G. Bryndina, S.V. Protasova, E.G. Butolin

Surfactant system of lung in rats with different resistance to stress under alloxan diabetes

Izhevsk State Medical Academy, 281, Kommunarov str., Izhevsk, 426034

It is shown that the surface active properties of lung under experimental diabetes mellitus was decreased on the background of increased LPL content in alveolar space. Surfactant changes correlated with the level of glucose, glycosylated hemoglobin and 11-oxycorticosteroids in blood. The obtained results indicate that the degree of impairment in the pulmonary surfactant system in alloxan diabetes depends on the resistance or susceptibility of animals to stress.

Key words: pulmonary surfactant, alloxan diabetes, individual stress resistance.

Аллоксановый диабет у лабораторных животных является моделью инсулинзависимого сахарного диабета, в патогенезе которого ключевую роль играет прогрессирующая гибель β -клеток поджелудочной железы [9]. В системе дыхания, как одном из важных компонентов жизнеобеспечения, происходят изменения при отклонении гомеостатических показателей, вызываемых нарушениями метаболизма при сахарном диабете, в том числе и в легочном сурфактанте, обеспечивающем респираторные и нереспираторные функции [12]. Реализация цитотоксического потенциала аллоксанового диабета опосредуется активацией процессов образования свободных радикалов [6], инициирующих перекисное окисление липидов. Состав фосфолипидов легочного сурфактанта, обеспечивающий поверхностно-активные свойства легких, подвергается в этих условиях модификации, что приводит к нарушению его функций. Сахарный диабет многими авторами рассматривается как метаболический (окислительный) стресс [2].

Нейровегетативные реакции на стресс и их метаболическое обеспечение имеют ряд особенностей в зависимости от индивидуальной реактивности особей к стрессу. На основании поведения животных, представляющего собой комплексный ответ, можно

прогнозировать их индивидуальную стресс-устойчивость [4].

В работе изучено формирование диабет-индуцированных изменений функциональных свойств и состава фосфолипидов легочного сурфактанта у животных в зависимости от прогностической устойчивости к эмоциональному стрессу.

Методика

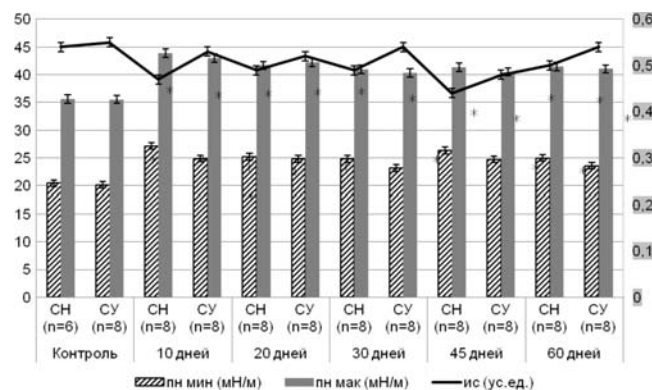
Моделирование сахарного диабета было проведено на 77 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г однократным введением аллоксана тетрагидрата (мезоксалилмочевина, «Fluka Chemika», Швеция) в дозе 170 мг/кг массы тела подкожно [8]. Содержание, уход за животными и выведение из эксперимента осуществляли в соответствии с «Правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике». В динамике развития сахарного диабета измеряли объем выпитой воды, диурез, массу тела, учитывали количество погибших крыс, а также определяли уровень глюкозы глюкозооксидазным методом (наборы «Витал Диагностикс», Россия) и гликозилированного гемоглобина (GHb) в крови при помощи наборов «Био-Ла-Тест» («Erba Lachema», Чехия). На основании предварительного тестирова-

ния животных по поведению в «открытом поле» выделяли группы активных (прогностически устойчивых — СУ) и неактивных (прогностически неустойчивых — СН) крыс [5]. Состояние легочного сурфактанта оценивали по показателям поверхностной активности бронхо-альвеолярных смывов: минимальному и максимальному поверхностному натяжению (ПН), рассчитанному на их основе индексу стабильности по J. Clements [11], содержанию общих фосфолипидов [3] и их фракций [10]. Экстракцию фосфолипидов осуществляли после центрифугирования бронхо-альвеолярных смывов смесью Блора для определения общих фосфолипидов или реактивом Фолча для определения их фракций. Фракционирование индивидуальных классов фосфолипидов производили методом восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля (пластины «Сорбфил», Россия) с дальнейшим денситометрическим анализом проб (денситометр «Сорбфил», Россия). Показатели сурфактантной системы легких исследовали на 10, 20, 30, 45 и 60 дни эксперимента. Оценивали степень развития стрессорных изменений по концентрации 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) флюориметрическим методом. Достоверность различий между группами крыс выявляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни, данные представляли как среднее значение ± ошибка средней. Для выявления корреляционной зависимости был использован ранговый тест Спирмена. Различия выборок считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения SPSS 11.5 for Windows.

Результаты и обсуждение

После введения диабетогенной дозы аллоксана у животных в обеих экспериментальных группах наблюдалась гипергликемия (табл. 1).

В динамике развития сахарного диабета отмечалось снижение поверхностно-активных свойств легких на всех сроках эксперимента (рисунок). Так, на 10-й и 20-й день в обеих группах животных возраста-



Показатели поверхностной активности сурфактанта в бронхо-альвеолярных смывах

ли показатели ПН, при этом у активных особей на этих сроках были зафиксированы максимальные значения уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина. К 30-му дню у активных крыс цифры ПН достоверно не отличались от контрольных величин.

На 45-й день было зафиксировано наименьшее значение индекса стабильности в обеих группах, составившее 78% ($p < 0,01$) и 86% ($p < 0,05$) от контрольного уровня соответственно у стресс-неустойчивых и стресс-устойчивых особей на фоне повышения цифр ПН и увеличения содержания глюкозы в крови у предрасположенных крыс на 52% ($p < 0,001$). На 60-й день показатели ПН оставались увеличенными в обеих группах, но при этом нормализовался индекс стабильности, а также уровень гликозилированного гемоглобина. Динамика изменений содержания 11-ОКС в крови у активных животных проявлялась в виде максимального повышения (более чем в 2 раза) на ранних сроках эксперимента с постепенным снижением к 60-му дню. У пассивных крыс после пика значения данного показателя на 10-й день развития диабета в последующем отмечалось его снижение к 30-му и 45-му дню.

Значительную роль в нарушении поверхностно-активных свойств сурфактанта играют изменения

Содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина и 11-ОКС в крови

Таблица 1

Показатели	Контроль		Аллоксан 10 дней		Аллоксан 20 дней		Аллоксан 30 дней		Аллоксан 45 дней		Аллоксан 60 дней	
	СН n = 8)	СУ n = 8)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 7)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 6)
Глюкоза, ммоль/л	5,93 ± 0,99	5,65 ± 0,18	9,38 ± 0,46*	9,84 ± 0,36*	8,28 ± 0,08*	8,44 ± 0,17*	7,6 ± 0,17*	7,58 ± 0,21*	9,17 ± 0,11*#	8,11 ± 0,23*	7,55 ± 0,08*#	7,8 ± 0,07*
ГНб, мкмоль фру/г Нб	5,53 ± 0,13	5,90 ± 0,28	7,47 ± 0,36*	8,54 ± 0,26*	8,3 ± 0,21*#	7,33 ± 0,37*	7,15 ± 0,37*	7,3 ± 0,43*	7,73 ± 0,12*	8,36 ± 0,35*	6,15 ± 0,44	6,22 ± 0,33
11-ОКС, мкг/л	102,7 ± 2,66	99,1 ± 5,48	209,2 ± 10,61*#	266,3 ± 2,4*	106,56 ± 3,39	113,9 ± 3,9*	69,3 ± 2,96*#	129,2 ± 4,9*	51,4 ± 0,8*#	107,5 ± 10,8	99,5 ± 8,05	82,9 ± 4,02*

Примечание.* — статистически значимые отличия от контроля; # — статистически значимые отличия между группами

Фракции фосфолипидов легочного сурфактанта

Показатели (мкмоль/г)	Контроль		Аллоксан 10 дней		Аллоксан 20 дней		Аллоксан 30 дней		Аллоксан 45 дней		Аллоксан 60 дней	
	СН n = 8)	СУ n = 8)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 7)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 6)
Общие фосфолипиды	37,14 ± 4,56	38,37 ± 3,49)	42,80 ± 6,24	52,95 ± 5,16*	40,50 ± 1,71#	70,38 ± 6,26*	73,14 ± 4,68*#	46,83 ± 4,74	37,78 ± 6,95	37,61 ± 3,81	40,06 ± 5,33)	37,83 ± 0,7
Фосфатидилхолин	18,74 ± 2,19	19,44 ± 1,67	7,3 ± 1,22*#	11,82 ± 1,5)*	9,61 ± 0,54*#	19,56 ± 1,71	18,81 ± 1,41	14,96 ± 1,71	5,89 ± 0,1*	8,34 ± 1,0*	10,9 ± 1,52*	13,3 ± 0,07*
Лизофосфатидилхолин	0,37 ± 0,04	0,38 ± 0,03	11,07 ± 1,43*	12,06 ± 1,24*	11,82 ± 0,56*#	17,02 ± 1,7*	16,43 ± 1,1*#	9,34 ± 1,15*	13,5 ± 2,54*	9,23 ± 0,96*	8,58 ± 1,08*#	5,94 ± 0,36*
Сфингомиелин	5,58 ± 0,6	5,7 ± 0,47	10,18 ± 1,18*	12,24 ± 1,24*	6,96 ± 0,28#	11,49 ± 1,28*	15,75 ± 1,1*#	7,05 ± 0,65	10,21 ± 1,9*	7,48 ± 0,74*	7,64 ± 0,1)#	5,27 ± 0,3
Фосфатидилэтанолламин	4,12 ± 0,55	4,24 ± 0,44	11,03 ± 2,16*	12,62 ± 0,83*	5,89 ± 0,37*#	9,39 ± 0,89*	13,84 ± 1*#	7,37 ± 0,65*	5,05 ± 1,1	6,05 ± 0,71*	6,55 ± 0,86*	6,16 ± 0,17*

Примечание. * — статистически значимые отличия от контроля; # — статистически значимые отличия между группами

спектра фосфолипидов (табл. 2). Уровень фосфатидилхолина, обеспечивающего в большей степени поверхностную активность сурфактанта, снижался в обеих исследуемых группах на 10-й, 45-й, 60-й дни и не имел достоверных отличий от контрольных значений к 30-му дню. Содержание лизофосфатидилхолина в динамике эксперимента превышало в несколько раз значения контрольных величин, что при аллоксановом диабете является результатом деацилирования фосфатидилхолинов на фоне активирования фосфолипазы А₂. Низкий уровень фосфатидилхолина и высокое содержание его лизоформ, обладающих мембранодеструктивным действием, способствуют дестабилизации функций легочного сурфактанта [7]. Наблюдаемое на всех сроках эксперимента изменение количества фосфатидилэтанолламина и фосфатидилхолина, вероятно, является результатом их взаимопревращения.

Корреляционная модель взаимосвязей у активных животных существенно отличалась от таковой в группе пассивных особей. Так, на 10-й день уровень общих фосфолипидов у стресс-устойчивых крыс имел положительную связь ($r = 0,98$, $p < 0,01$) с содержанием 11-ОКС в крови, в то время как у неустойчивых животных такой зависимости выявлено не было. Аналогичные закономерности были выявлены у стресс-устойчивых крыс в наших предыдущих работах по изучению влияния хронического иммобилизационного стресса на показатели сурфактантной системы легких [1]. Также в этой группе существовала прямая связь ($r = 0,94$, $p < 0,01$) между количеством фосфолипидов и индексом стабильности, являющегося показателем функциональной активности сурфактанта. На 20-й день в группе пассивных животных было установлено, что содержание гликозилированного гемоглобина, которое имело на данном сроке максимальное значение за все время наблюдения, от-

рицательно связано с уровнем фосфолипидов ($r = -0,98$, $p < 0,001$). У активных особей отмечалась положительная связь между уровнем глюкозы, гликозилированного гемоглобина и 11-ОКС, с одной стороны, и показателями поверхностного натяжения, с другой стороны. Если на протяжении 45 дней наблюдения в обеих группах животных между уровнем 11-ОКС и глюкозой в крови отмечалась положительная корреляционная зависимость, то к 60-му дню содержание 11-ОКС у неактивных крыс имело отрицательную связь ($r = -0,71$, $p < 0,01$) с уровнем глюкозы, а в группе активных — и с уровнем гликозилированного гемоглобина, что, возможно, связано с преобладанием влияния других контринсулярных гормонов.

Таким образом, аллоксановый диабет у крыс приводит к снижению поверхностно-активных свойств альвеолярного выстилающего комплекса и существенным изменениям фосфолипидного спектра легочного сурфактанта с увеличением доли сфингомиелина и лизофосфатидилхолина. Степень связанных с диабетом изменений сурфактантной системы легких коррелирует с уровнем глюкозы в крови, 11-ОКС и гликозилированного гемоглобина. Большая выраженность изменений изучаемых показателей наблюдается у стресс-неустойчивых животных.

Список литературы

1. Брындина И.Г., Данилов Г.Е., Васильева Н.Н. и др. Стресс и легкие / Патогенез. — 2007. — Т 5, №1-2. — С. 42-48.
2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. — М., 2001. — 256 с.
3. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. — Л., Медицина, 1981. — 407 с.

4. **Коплик Е.В., Салиева Р.М., Горбунова А.В.** Тест открытого поля как прогностический критерий устойчивости к эмоциональному стрессу у крыс линии Вистар / Журн. высш. нерв. деят. — 1995. — Т. 45, вып. 4. — С. 775-780.

5. **Коплик Е.В.** Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу / Вестн. нов. мед. технол. — 2002. — Т. 9, №1. — С. 16-18.

6. **Ланкин В.З., Корчин В.И., Коновалова Г.Г.** и др. Роль антиоксидантных ферментов и антиоксиданта пробукола в антирадикальной защите β -клеток поджелудочной железы при аллоксановом диабете / Бюл. экспериментал. биологии и медицины. — 2004. — Т. 137, №1. — С. 27-31.

7. **Мотавкин П.А., Гельцер Б.И.** Клиническая и экспериментальная патофизиология легких — М., Наука, 1998. — 366 с.

8. **Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г., Шорин Ю.П.** Количественная оценка чувствительности экспериментальных животных к диабетогенному действию аллокса-

на / Проблемы эндокринологии. — 1987. — №4. — С. 65-68.

9. **Пальчикова Н.А., Кузьминова О.И., Селятицкая В.Г.** Влияние перфторана на чувствительность животных к диабетогенному действию аллоксана и течение экспериментального диабета / Бюллетень СО РАМН. — 2006. — №3 (121). — С. 113-116.

10. **Покровский Е.А., Каргаполов А.В.** Модификация метода тонкослойной хроматографии фосфолипидов / Лаб. дело. — 1970. — №6. — С. 337-341.

11. **Clements J.A.** Surface tension of lung extracts / — 1957. — V. 95, N 1. — P. 170-172.

12. **Mendelson C.R.** Endocrinology of the Lung: Development and Surfactant Synthesis. — Medical, 2000. — 344 p.

Поступила 06.15.13

Сведения об авторах:

Васильева Наталья Николаевна — канд. мед. наук, доцент кафедры нормальной физиологии

Брындина Ирина Георгиевна — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии

Протасова Светлана Владимировна — канд. биол. наук, ассистент кафедры биохимии

Бутолин Евгений Германович — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии