

Тимофеева М.Р., Лукина С.А.

Сурфактантная система и водный баланс легких при моделировании нейродегенерации и очага патологической активности в черной субстанции

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

В работе проведен сравнительный анализ метаболизма сурфактанта и водного баланса легких при моделировании нейродегенерации и формировании очага патологической активности в черной субстанции мозга. **Методика.** Опыты выполнены на нелинейных крысах-самцах, в том числе контрольных, ложнопериорированных, с односторонним стереотаксическим введением нейротоксина 6-гидроксиамина (Sigma) в компактную часть черной субстанции и имплантацией нанопорошка металлического кобальта (Berlin) в ретикулярную часть структуры. Комплексные исследования включали определение фракций фосфолипидов сурфактанта тонкослойной хроматографией, общих фосфолипидов и холестерина в бронхоальвеолярных смывах и их поверхностно-активных свойств методом Вильгельми, активности фосфолипазы, интенсивности ПОЛ по содержанию ТБК-активных продуктов в легочной ткани, оценку водного баланса гравиметрическим методом. **Результаты.** Установлено, что интранигральное введение нейротоксина и имплантация кобальта в структуру мозга вызывали ухудшение поверхностной активности выстилающего комплекса альвеол на фоне дисбаланса фракционного состава липидов сурфактанта с разнонаправленными изменениями количества фосфолипидов и степени гидратации легких. Индуцирование очага патологической активности в черной субстанции сопровождалось повышением уровня альвеолярных фосфолипидов за счет лизофосфатидилхолина, сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина, интенсификацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) в легочной ткани и органной гипергидратацией. Моделирование нейродегенерации, характеризующейся уменьшением общих фосфолипидов, фосфатидилхолина и накоплением лизофосфатидилхолина в условиях активации фосфолипазного гидролиза, повышением кровенаполнения легких. **Заключение.** Нарушения метаболизма липидов сурфактанта и водного баланса легких, наряду с изменениями ритмогенеза и режима вентиляции легких, могут обуславливать развитие дизрегуляторной пневмопатии при дисфункции черной субстанции мозга.

Ключевые слова: сурфактант, водный баланс легких, черная субстанция, нейродегенерация, очаг патологической активности

Для корреспонденции: Тимофеева Марина Рудольфовна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, e-mail: martim18@yandex.ru

Для цитирования: Тимофеева М.Р., Лукина С.А. Сурфактантная система и водный баланс легких при моделировании нейродегенерации и очага патологической активности в черной субстанции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 31–35.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.06.2015

Timofeeva M.R., Lukina S.A.

Surfactant system and water balance of the lungs in modeling of neurodegeneration and focus of pathological activity in the substantia nigra

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

The comparative analysis of surfactant metabolism and water balance of the lungs in modeling the formation and neurodegeneration focus of pathological activity in the substantia nigra of the brain. **Methods.** Experiments were performed on male rats — nonlinear, including the control, sham operated with unilateral stereotaxic administration of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (Sigma) in the substantia nigra compact part and the implantation of cobalt metal nanopowder (Berlin) in the reticular part of the structure. Complex investigations included determination of surfactant phospholipid fractions by thin layer chromatography, total phospholipids and cholesterol in the bronchoalveolar lavage and surface-active properties by the Wilhelmy method, phospholipase activity, lipid peroxidation intensity on the content of TBA-active products in the lung tissue, evaluation of water balance using the gravimetric method. **Results.** It has been established that the introduction of intranigral neurotoxin and implantation of cobalt in the structure of the brain called the deterioration of the surface activity of

the alveolar lining set against the backdrop of an imbalance of fractional composition of surfactant lipids with multidirectional changes in the amount of phospholipids and the degree of hydration of the lung. Induction focus of pathological activity in the substantia nigra was accompanied by an increase in alveolar phospholipids by lysophosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine, intensification of lipid peroxidation of the lung tissue and organ hyperhydration. Modeling neurodegeneration — reduction of total phospholipids, phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine accumulation in terms of activation of phospholipase hydrolysis, increasing blood supply to the lungs. **Conclusion.** Metabolism of surfactant lipids and water balance in the lung, along with changes of rhythmogenesis and mode of ventilation, may lead to the development of dysregulation of pneumopathy with dysfunction of the substantia nigra of the brain.

Keywords: surfactant, water balance of the lungs, substantia nigra, neurodegeneration, the focus of pathological activity

For correspondence: Marina R. Timofeeva, Candidate of Medicine, Associate Professor at the Department of Pathophysiology work «Izhevsk State Medical Academy», 281, Kommunarov str., Izhevsk, 426034, Russian Federation, e-mail: martim18@yandex.ru

For citation: Timofeeva M.R., Lukina S.A. Surfactant system and water balance of the lungs in modeling of neurodegeneration and focus of pathological activity in the substantia nigra. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 31–35. (in Russ).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Timofeeva M.R. <http://orcid.org/0000-0002-6494-9245>

Lukina S.A. <http://orcid.org/0000-0002-3543-9617>

Received 25.06.2015

Введение

Согласно теории генераторных и системных механизмов нервных расстройств, дисрегуляторная патология органов и систем возникает как при выпадении контролирующих механизмов, так и при их патологическом изменении и усилении, являясь основой формирования нейропатологических синдромов [1]. Дисрегуляция nigrostriatalных структур мозга и их нейромедиаторных систем наиболее часто проявляется болезнью Паркинсона, в основе которой лежит прогрессирующая дегенерация дофаминсинтезирующих нейронов черной субстанции. Болезнь Паркинсона характеризуется комплексом двигательных и вегетативно-висцеральных расстройств, включающих, в том числе, изменения режима вентиляции легких и респираторного ритмогенеза. Однако эффективность работы системы внешнего дыхания зависит не только от газообменной, но и негазообменных функций легких. К важнейшим негазообменным функциям относят метаболизм липидов сурфактанта, обеспечивающего стабильность респираторного отдела и участие легких в контроле водного баланса [2]. Нарушение этих функций часто предшествует развернутой картине дыхательной недостаточности [3].

Цель исследования — проведение сравнительного анализа состояния сурфактантной системы и водного баланса легких при моделировании нейродегенерации и формировании очага патологической активности в черной субстанции мозга.

Методика

Экспериментальные исследования выполнены на нелинейных крысах-самцах массой 220—250 г с соблюдением правил работы с лабораторными животными (89/609/ЕЕС). У опытных крыс 1-й группы ($n = 9$), наркотизированных этиминалом натрия (50 мг/кг), воспроизводили нейродегенерацию черной субстанции мозга (SN) односторонним введением нейротоксина 6-гидроксидофамина (Sigma). Микроинъекцию 6 мкг 6-гидроксидофамина, растворенного в 3 мкл 0,05% аскорбиновой кислоты, осуществляли в компактную зону структуры по стереотаксическим координатам атласа мозга G.Рахипос [4]: $P = 5,3$; $L = 2,3$; $V = 7,6$. Дегенерация nigrostriatalных путей при введении 6-ОНДА проявляется повреждением и гибелью 77% дофаминсинтезирующих нейронов и снижением ферментативной активности тирозингидроксилазы функционирующих нейронов [5]. Действие нейротоксина оценивали через 1 мес. по развитию гипокинезии у животных в тесте «открытое поле». Контрольным крысам интранигрально вводили эквивалентный объем изотонического раствора натрия хлорида с аскорбиновой кислотой ($n = 9$). Животным 2-й группы ($n = 20$), которым имплантировали нанопорошок металлического кобальта (Cobalt met., Berlin) в ретикулярную зону черной субстанции мозга: $P = 5,8$; $L = 2$; $V = 8,1$, где локализованы ГАМКергические нейроны, формирующие эфферентные проекции структуры. Индуцирование очага па-

тологической активности при имплантации кобальта связано с нарушением анатомического строения нейронов, их мембранной возбудимости и медиаторной активности. Эти изменения проявляются деструкцией синаптических контактов, глиозом, накоплением в экстрацеллюлярной жидкости глутамата и формированием зеркального очага усиленного возбуждения в гомологичной структуре контралатерального полушария со стабильным уровнем синхронизированных пароксизмальных разрядов на 7-е — 10-е сут. от начала воздействия [1, 6, 7]. Контролем служили животные с погружением микроканюли ($n = 29$) в SN. После выполнения экспериментов проводили гистологический контроль локализации канюль и кобальта в структуре мозга. Получали бронхоальвеолярные смывы, биофизическим методом Вильгельми определяли поверхностную активность монослоя сурфактанта в цикле сжатия — растяжения пленки по минимальному и максимальному поверхностному натяжению с расчетом индекса стабильности альвеол по J.Clements [2]. Метаболизм липидов сурфактанта оценивали по содержанию фосфолипидов и холестерина в смывах [8], фракционному составу липидов [9]. Липиды экстрагировали смесью Блора с последующей её отгонкой для выделения общих фосфолипидов или реактивом Фолча для анализа их фракций. Фракционирование фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии с денситометрическим сканированием хроматограмм (денситометр «Сорбфил», Россия). Исследовали активность фосфолипазы A_2 по количеству жирной кислоты, отщепившейся от фосфолипидов [10]. Водный баланс легких оценивали гравиметрическим методом: по содержанию гемоглобина в крови и гомогенатах легочной ткани, массе сердца, влажных и высушенных легких рассчитывали общую, экстравазальную жидкость и кровенаполнение легких, сухой остаток [11]. Об интенсивности ПОЛ судили по накоплению ТБК-активных продуктов (МДА) в легочной ткани [12].

Статистический анализ выполнен на основе программного обеспечения SPSS 17 for Windows. Характер распределения параметров оценивали критерием Шапиро—Уилка. Для сравнения групп применяли непараметрический U-критерий Манна—Уитни. Взаимосвязь между показателями устанавливали ранговым коэффициентом корреляции Спирмена (r_s). Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартиля (Median, Q_1 — Q_3). Статистически значимым считали уровень $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что моделирование нейродегенерации и формирование очага патологиче-

ской активности в черной субстанции мозга сопровождались перестройкой метаболизма и противоположно направленными изменениями количества альвеолярных фосфолипидов (таблица). У животных через 1 мес. после введения нейротоксина в бронхоальвеолярных смывах статистически значимо снижались содержание общих фосфолипидов по сравнению с контролем (на 22%) и количество холестерина — на 78%. Уменьшение фосфолипидов в составе сурфактанта могло быть связано как со снижением синтетических процессов в альвеолоцитах II типа, так и с избыточной активацией процессов ферментативного гидролиза, о чем свидетельствуют статистически значимые: повышение активности фосфолипазы A_2 в опыте и обратная корреляция показателя с фосфолипидами ($r_s = 0,83$). Активация черной субстанции через 14 сут. после имплантации кобальта сопровождалась повышением продукции фосфолипидов: их доля в смывах возросла на 263% при уменьшении на 35% активности фосфолипазы A_2 (изменения статистически значимы), что отражает низкую интенсивность оборота альвеолярных липидов. Вместе с тем, оба вида воздействий приводили к значимым изменениям биофизических характеристик сурфактанта со снижением индекса стабильности альвеол. Ухудшение функций сурфактанта в условиях нейродегенерации структуры было связано с уменьшением в его составе на 40% фосфатидилхолина — основной фракции, определяющей поверхностно-активные свойства альвеолярной выстилки и увеличением на 19% лизофосфатидилхолина, обладающего детергентным действием на мембраны (рисунок). Аналогичная тенденция прослеживалась при имплантации кобальта в структуру — на 37% уменьшилась доля фосфатидилхолина и на 13% увеличилось количество лизосоединений; статистически значимо возросло абсолютное количество менее активных фракций — сфингомиелина и фосфатидилэтанолamina. Произошла существенная инверсия коэффициентов фосфатидилхолин/ лизофосфатидилхолин и фосфатидилхолин/сфингомиелин, значимо повысилась фракция фосфатидной кислоты. Дисбаланс альвеолярных фосфолипидов был обусловлен как активацией ферментов фосфолипазного гидролиза и накоплением лизофосфолипидов в условиях нейродегенерации, так и опосредован существенной интенсификацией процессов ПОЛ в экспериментальных группах, что подтверждается статистически значимой отрицательной связью уровня МДА с коэффициентом фосфатидилхолин/сфингомиелин ($r_s = 1,0$) при нейродегенерации и с индексом стабильности альвеол ($r_s = 0,62$) — в условиях активации черной субстанции.

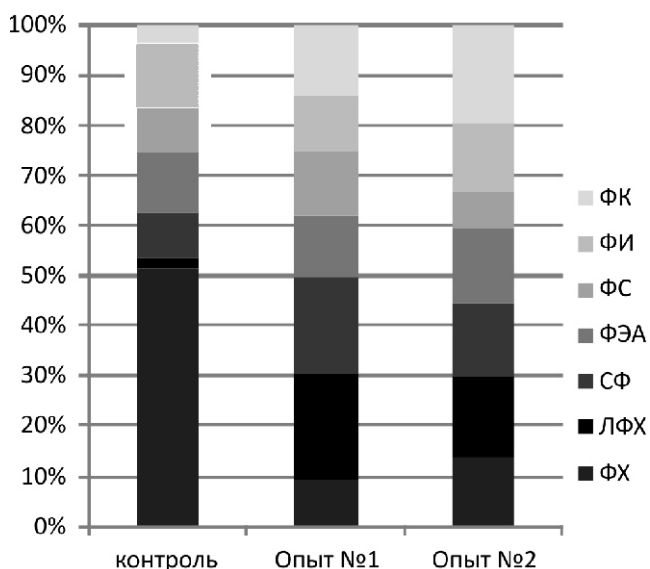
Сурфактант и водный баланс легких при дисфункции черной субстанции (SN)

Показатели	Моделирование нейродегенерации SN		Моделирование очага патологической активности в SN	
	Контроль (n = 9) Median (Q ₁ – Q ₃)	Опыт (n = 9) Median (Q ₁ – Q ₃)	Контроль (n = 29) Median (Q ₁ – Q ₃)	Опыт (n = 20) Median (Q ₁ – Q ₃)
Общие фосфолипиды, мкмоль/г	168,88 (149,7–183,7)	131,55 (101,9–144,2)*	149,51 (131,9–169,8)	512,94 (376,7–543,0)**
Фосфолипаза, Ед	31,56 (28,3–44,50)	52,56 (50,9–52,9)**	32,01 (29,1–39,6)	21,09 (18,5–21,7)**
Индекс стабильности, усл. ед.	0,71 (0,69–0,75)	0,57 (0,56–0,60)**	0,72 (0,68–0,75)	0,51 (0,43–0,53)**
Общая жидкость, %	105,41 (104,5–106,4)	106,25 (93,3–121,7)	101,25 (93,1–110,6)	115,57 (110,3–131,6)*
Кровенаполнение, %	5,90 (5,22–6,54)	12,22 (9,56–15,53)**	6,01 (5,89–7,07)	8,95 (7,34–11,10)*
Экстравакулярная жидкость, %	100,66 (99,0–103,3)	97,73 (85,4–109,8)	94,48 (89,1–109,6)	109,54 (102,7–122,5)*
Малоновый диальдегид, мкмоль/сух. ост.	0,20 (0,1–0,33)	1,47 (0,66–1,69)**	0,19 (0,13–0,22)	0,54 (0,35–0,69)**

Примечание. * p<0,05; ** p<0,01 — по сравнению с контролем

Изучение параметров водного баланса показало, что дисфункция черной субстанции сопровождалась существенным увеличением кровенаполнения легких. Однако, связь показателя кровенаполнения и индекса стабильности альвеол, косвенно отражающая зависимость биофизических свойств сурфактанта от условий гемодинамики, в опытах значимо уменьшалась относительно контроля ($r_s = 0,54$). При интранигральном введении нейротоксина возросшее легочное кровенаполнение сочеталось с низким содержанием альвеолярных фосфолипидов и их поверхностно-активной фракции — фосфатидилхолина. Выявленная диссоциация показателей, на наш взгляд, может быть следствием развития в легочной ткани нейродистрофического процесса, обусловленного дофаминовой дисфункцией вегетативных центров гипоталамуса, возникающей в условиях нейродегенерации [13] или дефицитом дофаминовой нейротрансмиссии в легочной ткани. В опытах с патологической активацией черной субстанции изменения в водном балансе характеризовались выраженной гипергидратацией легких с увеличением кровенаполнения и количества жидкости экстравакулярного сектора. В соответствии с теорией генераторных механизмов, деятельность генератора усиленного возбуждения сопровождается индуцированием вторичных очагов патологической активности в сопряженных структурах мозга [1]. Известно о роли лимбико-диэнцефальной дисрегуляции в патогенезе расстройств метаболизма сурфактанта и водного баланса легких [11, 14, 15]. По-видимому, количественные и качественные изменения альвеолярных липидов и гипергидратация легких явились результатом дисрегуляторных влияний черной субстанции с изменением гормональной и нейромедиаторной активности таких структур мозга, как гипоталамус, гиппокамп, амигдала, синее пятно, имеющих с черной субстанцией моносинаптические взаимосвязи.

Таким образом, моделирование нейродегенерации черной субстанции и формирование очага патологического возбуждения в структуре приводило к ухудшению свойств сурфактанта на фоне фракционного дисбаланса липидов в его составе с уменьшением фосфатидилхолина и накоплением лизофосфатидилхолина, и интенсификации перекисного окисления липидов легких. Изменение биофизических характеристик выстилающего комплекса альвеол при интранигральном введении нейротоксина сопровождалось уменьшением альвеолярных фосфолипидов и повышением органно-



Фракции фосфолипидов сурфактанта при дисфункции черной субстанции:
 опыт № 1 — моделирование нейродегенерации;
 опыт № 2 — моделирование очага патологической активности;
 ФХ — фосфатидилхолин; ЛФХ — лизофосфатидилхолин; СФ — сфингомиелин; ФЭА — фосфатидилэтаноламин; ФС — фосфатидилсерин; ФИ — фосфатидилинозитол; ФК — фосфатидная кислота.

го кровенаполнения, в условиях имплантации кобальта в структуру — увеличением общих фосфолипидов и гипергидратацией легочной ткани. Выявленные нарушения сурфактантной системы и водного баланса, наряду с изменениями ритмогенеза и режима вентиляции легких, могут обуславливать развитие дизрегуляторной пневмопатии при дисфункции черной субстанции мозга.

References

1. Gusev E.I., Kryzhanovskiy G.N., eds. *Dizregulyatsionnaya pathology of the nervous system*. Moscow: Medicinskoe informatsionnoe agentstvo; 2009. (in Russian)
2. Berezovskiy V.A., Gorchakov V.Yu. *Surfactants lung*. Kiev: Nauk. Dumka; 1982. (in Russian)
3. Salim A., Martin M., Brown C., Inaba K., Browder T., Rhee P. et al. The presence of the adult respiratory distress syndrome does not worsen mortality or discharge disability in blunt trauma patients with severe traumatic brain injury. *Injury*. 2008; 39 (1): 30-5.
4. Paxinos G., Watson Ch. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press; 1998.
5. Khudoerkov R.M., Voronkov D.N., Yamshchikova N.G. Immunohistochemical and morphological changes of neurons and glia in the brain structures of the nigrostriatal neurodegeneration in modeling of substantia nigra. *Vyull. eksperim. biol. i med.* 2012; 153 (6): 876-80. (in Russian)
6. Avakyan G.N., Badalyan O.L., Burd S.G., Avakyan G.G., Chukanova A.S., Stoyko M. I. et al. Experimental and clinical epileptology. *Epilepsy*. 2010; 4: 41-54. Available

at: <http://www.epilepsia.su/article.php?what=97> (Accessed 14 March 2011) (in Russian)

7. Chang J.H., Yang X.F., Zempel J.M., Rothman S.M. The unilateral cobalt wire model of neocortical epilepsy: a method of producing subacute focal seizures in rodents. *Epilepsy Res.* 2004; 61(1-3): 153- 60.
8. Komarov F.I., Korovkin B.F., Men'shikov V.V. *Biochemical studies in the clinic*. Leningrad: Medicina; 1981. (in Russian)
9. Kondrakhin I.P., ed. *Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics*. Moscow: KoloS; 2004. (in Russian)
10. Tuzhilin S.A., Saluen'ya A.I. Method for determination of phospholipase A in serum. *Laborator diagnostics*. 1975; 6: 334-5. (in Russian)
11. Tel' L.Z., Lysenkov S.P. *Central nervous mechanisms of pulmonary edema*. Alma-Ata: Kazakhstan; 1989. (in Russian)
12. Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl4 intoxication and vitamin E deficiency. *Biochem. Med.* 1980; 23 (3): 302-11.
13. Politis M., Piccini P., Pavese N., Koh S.B, Brooks D.J. Evidence of dopamine dysfunction in the hypothalamus of patients with Parkinson's disease: an in vivo 11C-raclopride PET study. *Exp Neurol*. 2008; 214(1): 112-6.
14. Danilov G.E., Myagkov A.V., Bryndina I.G., Vasil'eva N.N. *The role of stress protective structures of the brain in the regulation of visceral functions*. Moscow: RAMN; 2004. (in Russian)
15. Lukina S.A., Timofeeva M.R., Volkova E.V. The role of GABA-ergic mediator system in realisation hippocampal influences on the metabolic lung's functions. *Vestnik Tverskogo gos. Universiteta. Seriya «Biologiya i ekologiya»*. 2013; 29(2): 167 -75. (in Russian)

Сведения об авторах:

Лукина Светлана Александровна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, e-mail: saluk@mail.ru