

УДК 612.28.815. 1:616.379-008.64:615.262.1

СУРФАКТАНТНАЯ СИСТЕМА ЛЕГКИХ КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ СТРЕСС-УСТОЙЧИВОСТЬЮ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ДАЛАРГИНА

И.Г. Брындина, Н.Н. Васильева

Ижевская государственная медицинская академия

В работе изучено влияние даларгина в условиях аллоксанового диабета на поверхностно-активные свойства и биохимический состав легочного сурфактанта у крыс с разной стресс-резистентностью. Показано, что даларгин оказывает модулирующее адаптивное влияние на сурфактантную систему легких при аллоксановом диабете, более выраженное у стресс-устойчивых крыс, что проявляется в повышении функциональной активности сурфактанта легких и стабилизации состава альвеолярных фосфолипидов.

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

Введение. Одной из экспериментальных моделей сахарного диабета, позволяющей изучить различные стороны его влияния на организм, является аллоксановый диабет [6]. В аппарате внешнего дыхания при сахарном диабете наблюдают ряд функциональных и дисметаболических расстройств, в том числе связанных с нарушением продукции основных компонентов сурфактанта альвеолоцитами II типа [9; 10]. Реализация цитотоксического потенциала аллоксанового диабета опосредуется активацией процессов образования свободных радикалов [4], инициирующих перекисное окисление липидов и развитие метаболического, оксидативного стресса. Состав фосфолипидов легочного сурфактанта, обеспечивающий поверхностно-активные свойства легких, подвергается в этих условиях модификации, что приводит к нарушению его функций. Возможность использования синтетического аналога лей-энкефалина даларгина в коррекции изменений, возникающих при развитии аллоксанового диабета, запускающего процесс активации свободных радикалов и ПОЛ, представляется перспективной, поскольку в ряде экспериментальных работ [5; 8] было продемонстрировано выраженное антиоксидантное действие даларгина.

Известно, что надежным критерием резистентности животных к различным стрессовым воздействиям является двигательная активность крыс в «открытом поле» [3]. В частности, более активные особи проявляют большую устойчивость к действию стрессорных факторов по сравнению с пассивными.

Целью работы – изучение функциональной активности и состава

фосфолипидов легочного сурфактанта при введении синтетического аналога лей-энкефалина даларгина стресс-устойчивым и стресс-неустойчивым крысам в динамике развития экспериментального сахарного диабета.

Материал и методика. Эксперименты проводили на 174 белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г, предварительно тестированных по поведению в «открытом поле» [3]. Выделяли группы активных (прогностически стресс-устойчивых – СУ) и неактивных (прогностически стресс-неустойчивых – СН) крыс. В постановке опытов руководствовались правилами проведения работ на экспериментальных животных (приложение к приказу Министерства здравоохранения № 267 от 19.06.2003). Моделирование сахарного диабета было проведено однократным введением аллоксана тетрагидрата (мезоксалилмочевина, «Fluka Chemika», Швеция) в дозе 170 мг/кг массы тела подкожно. 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 в крови при помощи наборов «Lachema» («Лакхема Диагностика Брно», Словакия). На фоне аллоксанового диабета даларгин (НПО «Микроген» ФГУП) вводили внутримышечно в дозе 0,1 мг/кг массы животного через каждые 72 часа.

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 [1], содержанию общих фосфолипидов [2] и их фракций [7]. Экстракцию фосфолипидов осуществляли после центрифугирования бронхо-альвеолярных смывов смесью Блюра для определения общих фосфолипидов или реактивом Фолча для определения их фракций. Фракционирование индивидуальных классов фосфолипидов производили методом восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля (пластины «Merck», Германия) с дальнейшим денситометрическим анализом проб (денситометр «Сорбфил», Россия). Показатели сурфактантной системы легких исследовали на 10, 20, 30, 45 и 60 дни эксперимента.

Для сравнения параметров в группах использовали U-критерий Манна-Уитни. 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. При аллоксановом диабете на фоне многократных инъекций даларгина понижение поверхностно-активных

Таблица 1

Показатели поверхностной активности легочного сурфактанта
при введении даларгина на фоне аллоксанового диабета
у стресс-устойчивых и стресс-неустойчивых крыс

Группа		ПН миним., мН/м	ПН максим., мН/м	ИС, усл.ед.
Контроль (n=14)	СН	20,47±0,27	35,63±0,4	0,54±0,02
	СУ	20,2±0,25	35,55±0,36	0,55±0,01
10 дней (n=32)	СН (А+Д)	22,08±0,22*	38,72±0,34*	0,55±0,01
	СН (А)	27,17±0,47*	43,87±0,4*	0,47±0,02*#
	СУ (А+Д)	22,8±0,24*	40±0,28*	0,55±0,01
	СУ (А)	24,9±0,13*	43,0±0,18*	0,53±0,01
20 дней (n=32)	СН (А+Д)	22,8±0,22*	36,75±1,1	0,47±0,01*#
	СН (А)	25,20±0,14**	41,68±0,15*	0,49±0,01*
	СУ (А+Д)	22,12±0,21*	39,12±0,3*	0,55±0,005
	СУ (А)	24,86±0,45*	42,20±0,88*	0,52±0,01
30 дней (n=32)	СН (А+Д)	22,53±0,13*	39,37±0,28*	0,54±0,01
	СН (А)	24,8±0,87*#	40,96±0,66*	0,49±0,02*#
	СУ (А+Д)	20,88±0,21	36,84±0,23*	0,55±0,01
	СУ (А)	23,15±0,34	40,30±0,41*	0,54±0,01
45 дней (n=32)	СН (А+Д)	23,12±0,15*	41±0,11*	0,56±0,005
	СН (А)	26,36±0,58*	41,36±0,84*	0,44±0,03*
	СУ (А+Д)	22,72±0,31*	40,36±0,35*	0,56±0,01
	СУ (А)	24,75±0,3*	40,50±0,3*	0,48±0,01*
60 дней (n=32)	СН (А+Д)	22,28±0,27*	39,26±0,56*	0,55±0,01
	СН (А)	25,0±0,11*#	41,48±0,41*	0,50±0,01*
	СУ (А+Д)	22,35±0,26*	39,9±0,39*	0,56±0,01
	СУ (А)	23,60±0,52*	41,05±0,41*	0,54±0,02

Примечание. * – статистически значимые отличия от контроля ($p \leq 0,05$); # – статистически значимые отличия между СН и СУ животными ($p \leq 0,05$). А – аллоксановый диабет, А+Д – введение даларгина на фоне аллоксанового диабета.

Так, у СН крыс на 10-й день сочетанного воздействия минимальное ПН снижалось по сравнению с изолированным диабетом на 19% ($p \leq 0,01$). Индекс стабильности в этой группе на фоне инъекций даларгина был на уровне контрольных величин, тогда как при «чистом» диабете снижение составляло 13% ($p \leq 0,05$), при этом введение даларгина сглаживало и межгрупповые различия по данным показателям. У СУ крыс введение даларгина также снижало степень изменений поверхностной активности легочного сурфактанта. На 20-й день у СН животных минимальное ПН оставалось повышенным на 11% ($p \leq 0,05$), что было ниже соответствующего значения при диабете. На этом сроке сохранялось аллоксан-индуцированное снижение индекса стабильности по отношению к контролю на 13% ($p \leq 0,01$), что также было ниже аналогичного показателя СУ особей ($p \leq 0,05$). В

последующие периоды наблюдения в обеих группах сравнения повышение цифр ПН на фоне введения даларгина было меньшим по сравнению с аллоксановым диабетом, при этом межгрупповых отличий зафиксировано не было.

Таблица 2

Фосфолипиды легочного сурфактанта при введении даларгина на фоне аллоксанового диабета у стресс-устойчивых и стресс-неустойчивых крыс

Группа		ОФЛ, мкмоль/г	ФХ, мкмоль/г	ЛФХ, мкмоль/г	Сф, мкмоль/г
Конт- роль (n=14)	СН	37,14±4,56	18,74±2,19	0,37±0,04	5,58±0,6
	СУ	38,37±3,49	19,44±1,67	0,38±0,03	5,7±0,47
10 дней (n=32)	СН (А+Д)	32,81±2,27	12,4±0,68*#	6,3±0,68*	6,6±0,51
	СН (А)	42,80±6,24	7,3±1,22*#	11,07±1,43*	10,18±1,18*
	СУ (А+Д)	37,82±3,22	16,24±1,37	6,14±0,67*	6,3±0,6
	СУ (А)	52,95±5,16*	11,82 ± 1,5*	12,06±1,24*	12,24±1,24*
20 дней (n=32)	СН (А+Д)	33,2±0,89	11,48 0,3*#	6,92±0,53*	5,93±0,23
	СН (А)	40,50±1,71#	9,61±0,54*#	11,8±0,56*#	6,96 ± 0,28#
	СУ (А+Д)	43,01±2,59	18,07±1,19	6,19±0,44*	6,3±0,46
	СУ (А)	70,38±6,26*	19,56±1,71	17,02±1,7*	11,49±1,28*
30 дней (n=32)	СН (А+Д)	40,1±1,72	15,67±0,64	5,94±0,4*#	6,83±0,3#
	СН (А)	73,14±4,7*#	18,81±1,41	16,43±1,1*#	15,75±1,1*#
	СУ (А+Д)	38,15±1,93	16,13±1,01	4,73±0,1*	5,79±0,29
	СУ (А)	46,83±4,74	14,96±1,71	9,34±1,15*	7,05±0,65
45 дней (n=32)	СН (А+Д)	37,53±1,14	16,35±0,47	4,28±0,22*#	5,94±0,28
	СН (А)	37,78±6,95	5,89±0,1*	13,5±2,54*	10,21±1,9*
	СУ (А+Д)	35,51±1,39	16,57±0,57	3,49±0,16*	5,33±0,28
	СУ (А)	37,61±3,81	8,34±1,0*	9,23±0,96*	7,48±0,74*
60 дней (n=32)	СН (А+Д)	36,41±1,8	17,12±0,75	3,52±0,21*	5,43±0,22#
	СН (А)	40,06±5,33	10,9±1,52*	8,58±1,08*#	7,64±0,1#
	СУ (А+Д)	35,26±1,79	17,1±0,85	3,08±0,19*	4,75±0,13
	СУ (А)	37,83±0,7	13,3±0,07*	5,94±0,36*	5,27±0,3

Примечание. * – статистически значимые отличия от контроля ($p \leq 0,05$); # – статистически значимые отличия между СН и СУ животными ($p \leq 0,05$). А – аллоксановый диабет, А+Д – введение даларгина на фоне аллоксанового диабета.

Индукцированное диабетом повышение количества ОФЛ устранялось введением даларгина на всех сроках наблюдения в обеих экспериментальных группах (табл. 2). Содержание основной фракции фосфолипидов – фосфатидилхолина – у СУ крыс не имело достоверных отличий от контрольных цифр во все исследуемые сроки, тогда как при диабете без введения даларгина имело место снижение процентной величины этой фракции на всем протяжении эксперимента. У СН животных на 10-й и 20-й день уровень фосфатидилхолина был снижен как относительно контроля (на 34%, $p \leq 0,01$ и на 39%, $p \leq 0,01$

соответственно), так и по отношению к СУ особям (на 24%, $p \leq 0,05$ и на 36%, $p \leq 0,01$ соответственно). В последующие сроки на фоне инъекций даларгина у этих животных происходило восстановление содержания фосфатидилхолина до контрольных величин. Уровень лизофосфатидилхолина, существенно повышающийся при диабете, на фоне введения даларгина становился ниже, хотя и не достигал контрольных величин.

Провоцируемое аллоксановым диабетом повышение в составе фосфолипидов доли сфингомиелина на фоне введения даларгина устранялось – достоверных отличий от исходных цифр зафиксировано не было, при этом на сроке 30 и 60 дней содержание данной фракции у стресс-устойчивых животных было ниже по отношению к стресс-неустойчивым ($p \leq 0,05$).

При анализе взаимосвязей параметров поверхностной активности и спектра альвеолярных фосфолипидов было обнаружено, что восстановившийся на фоне введения даларгина индекс стибильности на разных сроках сочетанного воздействия в обеих группах наблюдения коррелировал с коэффициентами фосфатидилхолин/лизофосфатидилхолин ($r=0,85$, $p \leq 0,01$) и фосфатидилхолин / сфингомиелин ($r=0,75$, $p \leq 0,05$), а показатели ПН минимального были отрицательно связаны с уровнем общих фосфолипидов ($r=-0,80$, $p \leq 0,01$) и фосфатидилхолина ($r=-0,78$, $p \leq 0,05$). Таким образом, коррекция даларгином повышения уровня лизофосфатидилхолина и сфингомиелина при экспериментальном сахарном диабете, а также восстановление содержания фосфатидилхолина в составе фосфолипидов сурфактанта имело значение при стабилизации показателей его поверхностно-активных свойств. По-видимому, цитопротективные и антиоксидантные свойства даларгина препятствуют полной реализации окислительного потенциала аллоксанового диабета и, тем самым, предотвращают снижение функциональной активности сурфактанта.

Заключение. Резюмируя полученные результаты, можно отметить, что введение даларгина способствует коррекции сниженных при диабете поверхностно-активных свойств альвеолярного выстилающего комплекса, прежде всего за счет восстановления большинства показателей липидного спектра сурфактанта, которое у стресс-устойчивых крыс реализуется на более ранних сроках введения даларгина.

Список литературы

1. Березовский В.А., Горчаков В.Ю. Поверхностно-активные вещества легкого. Киев: Наукова думка, 1982. 168 с.
2. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. Л: Медицина, 1981. 407 с.

3. *Коплик Е.В.* Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу // Вестн. нов. мед. технол. 2002. Т. 9, № 1. С. 16–18.
4. *Ланкин В.З., Корчин В.И., Коновалова Г.Г., Лисина М.О., Тихазе А.К., Акмаев И.Г.* Роль антиоксидантных ферментов и антиоксиданта пробукола в антирадикальной защите β -клеток поджелудочной железы при аллоксановом диабете // Бюл. эксперим. биол. и медицины. 2004. Т. 137, №1. С. 27–31.
5. *Лебедько О.А., Тимошин С.С.* Коррекция даларгином нарушений процессов синтеза ДНК и свободнорадикального окисления, индуцированных L-NAME, в органах дыхания новорожденных белых крыс // Бюл. эксперим. биол. и медицины. 2002. Т. 133, № 5. С. 501–503.
6. *Пальчикова Н.А., Кузьминова О.И., Селятицкая В.Г.* Влияние перфторана на чувствительность животных к диабетогенному действию аллоксана и течение экспериментального диабета // Бюл. СО РАМН. 2006. № 3 (121). С. 113–116.
7. *Покровский Е.А., Каргаполов А.В.* Модификация метода тонкослойной хроматографии фосфолипидов // Лаб. дело. 1970. № 6. С. 337–341.
8. *Таджибова Л.Т., Астаева М.Д., Исмаилова Ж.Г., Даудова Т.Н., Кличханов Н.К.* Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии // Бюл. эксперим. биол. и медицины. 2010. Т. 150, № 9. С. 271–274.
9. *Foster D.J., Ravikumar P., Bellotto D.J., Unger R.H., Hsia C.W.* Fatty diabetic lung: altered alveolar structure and surfactant protein expression // Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. 2010. Vol. 298, № 3. P. 392–403.
10. *West J.B.* Respiratory physiology – the essentials. Baltimore: Williams and Wilkins, 2008. 186 p.

**LUNG SURFACTANT SYSTEM OF RATS WITH DIFFERENT
STRESS RESISTANCE IN ALLOXAN DIABETES AFTER
ADMINISTRATION OF DALARGIN**

I.G. Bryndina, N.N. Vasilyeva

Izhevsk State Medical Academy

In the present work the effect of dalargin on surface-active properties and biochemical composition of lung surfactant of rats with different stress resistance in experimental alloxan diabetes was explored. It is shown that dalargin exerts the adaptive influence upon the lung surfactant in rats with alloxan diabetes, increasing its functional activity and modulating the composition of alveolar phospholipids.

Keywords: *pulmonary surfactant, alloxan diabetes, dalargin, individual stress resistance*

Об авторах:

БРЫНДИНА Ирина Георгиевна—доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой профпатологии, ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России», 426034, Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281, e-mail: bryndina@udm.net

ВАСИЛЬЕВА Наталья Николаевна—кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России», 426034, Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281.