

ЛУКИНА С. А., ЛУЖБИНА Р. В.

**ДИЗРЕГУЛЯЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СУРФАКТАНТА И ВОДНОГО БАЛАНСА
ЛЕГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА
И ГИПОКСИЧЕСКОМ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИИ**

Аннотация. Представлены результаты исследования сурфактантной системы, водного баланса легких, про- и антиоксидантной активности легочной ткани при экспериментальной однодневной неполной глобальной ишемии головного мозга, вызванной двусторонней окклюзией общих сонных артерий. Даны оценка эффективности раннего и позднего гипоксического прекондиционирования, выполненного посредством циклических гипоксических тренировок, предшествующих эпизоду ишемии. Опыты выполнены на крысах-самцах, в том числе ложнооперированных и контрольных. Установлено, что в условиях ишемии понижается поверхностная активность сурфактанта, что сопряжено с активацией перекисного окисления липидов и высокой активностью фосфолипазного гидролиза, увеличивается кровенаполнение легких. Применение раннего и позднего прекондиционирования не устраниет дизрегуляционных расстройств сурфактанта и водного баланса легких.

Ключевые слова: ишемия мозга, гипоксическое прекондиционирование, сурфактант легких, кровенаполнение легких.

LUKINA S. A., LUZHBINA R. V.

**DISREGULATORY CHANGES IN SURFACTANT AND LUNG WATER BALANCE IN
EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA AND HYPOXIC PRECONDITIONING**

Abstract. The results of the study of the surfactant system, water balance of the lungs, pro- and antioxidant activity of the lung tissue in experimental one-day incomplete global cerebral ischemia caused by bilateral occlusion of the common carotid arteries are presented. The effectiveness of early and late hypoxic preconditioning performed by means of cyclic hypoxic training prior to an ischemic episode was evaluated. The experiments were performed on male rats, including sham-operated and control ones. It has been established that under conditions of ischemia, the surface activity of the surfactant decreases, which is associated with the activation of lipid peroxidation and high activity of phospholipase hydrolysis, and the blood filling of the lungs increases. The use of early and late preconditioning does not eliminate dysregulatory disorders of surfactant and lung water balance.

Keywords: cerebral ischemia, hypoxic preconditioning, lung surfactant, lung blood filling.

Актуальность. Проблема разработки терапевтических стратегий для осуществления нейропротекции у пациентов с ишемическим повреждением головного мозга не перестает быть актуальной. Это во многом обусловлено высокой летальностью и инвалидацией больных с острыми расстройствами мозгового кровообращения. Наряду с нарушением когнитивных функций и неврологической симптоматикой у пациентов часто развиваются дисрегуляционные висцеропатии [1; 2]. Расстройства в системе внешнего дыхания в 22% случаев являются причиной летальных исходов пациентов с ишемическим инсультом [2; 3]. Ранее нами было установлено, что фактором патогенеза дыхательной недостаточности при экспериментальной ишемии мозга являются нарушения нереспираторных функций легких с развитием органной гипергидратации и дисфункции сурфактанта [4].

Известно, что тяжелая ишемия/гипоксия приводит к деструктивным изменениям нейронов, значительным нарушениям метаболизма, угнетению нейропластичности мозга. В то же время умеренные гипоксические стимулы обладают нейропротективным действием, индуцируя активацию эндогенных саногенетических программ, повышают устойчивость мозга к тяжелой гипоксии. Феномен метаболической адаптации головного мозга к гипоксии, известный как прекондиционирование, широко обсуждается в современной литературе [5]. Известно о двух фазах ишемической толерантности мозга: ранней, развивающейся через несколько минут после сублетального стимула, и поздней, эффекторные механизмы которой реализуются через 24 часа после гипоксии. Полагают, что раннее прекондиционирование обеспечивается изменениями внутриклеточного метаболизма нейронов, а поздняя фаза реализуется посредством синтеза белков *de novo* [5]. Широко обсуждаются механизмы адаптивного действия прекондиционирования на структуры мозга, однако недостаточно данных о состоянии висцеральных функций организма при использовании различных его протоколов в условиях ишемического повреждения мозга.

Цель исследования. Определение роли раннего и позднего гипоксического прекондиционирования в коррекции дисрегуляционных расстройств сурфактантной системы и водного баланса легких, индуцированных экспериментальной ишемией головного мозга.

Материалы и методы. Исследования проводились на беспородных крысах-самцах массой 200-250г. в соответствии с Правилами лабораторной практики при работе с экспериментальными животными (приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 г. № 708, Директива 2010/EU Европейского парламента). Животные были распределены по группам: 1 – интактные (n=11), 2 – ложнооперированные (n=20), 3 – с проведением интервальных гипоксических тренировок (n=13), 4 – с моделированием неполной глобальной ишемии головного мозга (n=19), 5 – с использованием раннего прекондиционирования (n=15), 6 – с использованием позднего прекондиционирования (n=15). Поскольку достоверных различий

показателей у интактных и ложнооперированных животных не наблюдалось, за основной контроль принимали данные ложнооперированных крыс. Для моделирования неполной глобальной ишемии головного мозга у крыс осуществляли необратимую билатеральную окклюзию общих сонных артерий [6], отделяя сосуды от элементов сосудисто-нервного пучка с последующим их перевязыванием. Ложнооперированным животным выделяли сосуды без дальнейшей перевязки. Нормобарические гипоксические тренировки осуществляли в течение четырех дней в цикличном режиме по четыре эпизода гипоксии и реоксигенации по 10 минут каждый [7]. Для тренировок использовали гермокамеру с проточной вентиляцией объемом 3,3 л. Для раннего прекондиционирования проводили гипоксические тренировки с последующей (через час после последнего эпизода гипоксии) окклюзией общих сонных артерий. Для позднего прекондиционирования ишемию мозга моделировали через сутки после завершения гипоксических тренировок [7]. У выживших животных определяли наличие признаков неврологического дефицита по шкале Stroke-index Mc. Graw в модификации И.В. Ганнушкиной [8]. Нереспираторные функции легких исследовали через сутки после моделирования ишемии мозга. У наркотизированных животных извлекали бронхоальвеолярный комплекс, промывали дегазированные легкие изотоническим раствором натрия хлорида. Полученные бронхоальвеолярные смывы помещали в тефлоновую кювету с подвижным барьером для изучения их поверхностно-активных свойств методом Вильгельми-Лэнгмюра. С этой целью определяли статическое поверхностное натяжение (ПН) мономолекулярной пленки методом отрыва от нее вертикальной пластиинки, далее оценивали минимальное и максимальное ПН в динамике сжатия и растяжения монослоя сурфактанта с последующим расчетом индекса стабильности альвеол по J. Clements. Содержание фосфолипидов (ФЛ) в составе бронхоальвеолярных смывов определяли по уровню неорганического фосфора, содержание холестерина (ХЛ) определяли с помощью колориметрического метода (диагностикум Холестерин-11/21/31-Витал, СПб), с последующим расчетом коэффициента ФЛ/ХЛ, фосфолипазную активность оценивали по содержанию жирных кислот, образующихся в результате фосфолипазного гидролиза. Водный баланс легких изучали, рассчитывая гравиметрические коэффициенты методом Gaar K.A. в модификации А.В. Бобрикова. Гемиглобинцианидным методом оценивали содержание гемоглобина в крови и гомогенате легочной ткани (диагностикум НПО «Ренам», Москва). Учитывая вес сердца, влажных и высушенных легких, определяли кровенаполнение легких, содержание в них общей и экстраваскулярной жидкости. Для оценки прооксидантной активности легочной ткани определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) в гомогенате легочной ткани в реакции с тиобарбитуровой кислотой («Агат-Мед», Москва). Активность каталазы оценивали методом Королюка М.А.

Статистический анализ результатов выполнен с помощью программного обеспечения «Microsoft Excel 2010» и Statistica 6.0, «SPSS 19 for Windows» с использованием непараметрического U-критерий Манна-Уитни, коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически достоверным считали уровень значимости $p < 0,05$, $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение. Было установлено, что через сутки после ишемии мозга летальность животных составила 37%, неврологический дефицит $8,5 \pm 1,0$ баллов. Изменился фракционный состав сурфактанта с увеличением содержания фосфолипидов на 73% [$Z = -3,97$; $p = 0,0001$] (табл. 1). Однако ПН минимальное бронхоальвеолярных смывов возросло [$Z = -3,29$; $p = 0,001$], уменьшился интегральный показатель, характеризующий свойства выстилающего альвеолярного комплекса, индекс стабильности альвеол [$Z = -3,98$; $p = 0,0001$].

Таблица 1

Показатели сурфактантной системы и водного баланса легких при ишемии мозга, гипоксических тренировках, раннем и позднем прекондиционировании (Ме [Q1; Q3])

Показатели	Контроль	Ишемия мозга	Гипоксические тренировки	Раннее ПРК	Позднее ПРК
ФЛ, мкмоль/г	152,39 [146,90;193,26]	318,17** [224,6; 381,80]	105,36**^ [95,37;121,47]	203,83## [161,99;242,18]	154,30 ^## [139,00;197,10]
ХЛ, мкмоль/г	65,50 [59,18;74,83]	61,83 [46,24; 75,40]	71,29 [61,45;75,62]	49,88 [46,65;70,84]	62,90 [57,80;79,80]
ФЛ/ХЛ, усл.ед	2,24 [1,70;2,80]	4,81 ** [4,39; 6,71]	1,49*^ [1,29;1,85]	3,57**^## [3,15;3,90]	2,40^## [1,76; 3,20]
Фосфолипаза, Ед.	31,20 [27,40;36,50]	52,00** [40,88; 66,60]	58,52 ** [55,14;63,62]	60,94**^ [50,17;78,69]	75,80**^# [56,10;89,40]
ПН стат., мН/м	30,80 [26,80;32,60]	30,30 [27,65;32,00]	27,40* [26,80;27,60]	29,90 [29,05;30,75]	28,70 ## [27,90;30,05]
ПН мин., мН/м	17,40 [15,00;18,20]	19,60** [19,40;21,45]	18,20 [18,00;18,40]	20,00*# [19,10;21,65]	19,50**# [17,85;20,75]
ПН макс., мН/м	36,00 [35,20;36,50]	32,70** [30,90; 33,15]	32,30 ** [31,65;33,00]	34,60 [33,05;37,35]	33,00** [31,10;33,75]
Индекс стабильности, усл. ед.	0,70 [0,63;0,75]	0,45 ** [0,43; 0,51]	0,56**^ [0,54;0,59]	0,53**^ [0,49;0,58]	0,49**# [0,46;0,54]
Общая жидкость, %	108,18 [96,88;121,10]	115,50 [113,00;128,50]	98,53 ^ [97,12; 103,33]	114,30## [104,25;128,53]	108,30## [105,13;110,53]
Кровенаполнение легких, %	7,40 [6,46;8,02]	9,30 ** [7,96; 11,40]	4,91*^ [3,42;7,79]	10,43**## [8,54;12,83]	5,06**^ [4,44;5,31]
Экстраваск. жидкость, %	102,22 [95,36;115,00]	105,60 [103,05;121,50]	93,77*^ [92,35;96,37]	106,23# [93,30;118,25]	103,45## [101,23;105,22]
МДА, мкмоль/г/сух.ост.	0,20 [0,12;0,28]	0,61* [0,47;0,81]	0,27^ [0,26;0,29]	0,40**^ [0,30;0,50]	0,36*^ [0,33;0,37]
Каталаза, М/мин/г/сух.ост.	12,66 [10,74;20,69]	16,15 ** [14,75;18,74]	12,69^ [12,07;14,20]	6,76^## [4,53;8,99]	9,94 *^## [9,39; 9,99]

Примечание: значимые отличия от контрольной группы – *, группы с ишемией мозга – ^, группы с гипоксическими тренировками – #,(1 знак – $P < 0,05$; 2 знака – $P < 0,01$).

Выявленные изменения свойств сурфактанта могли быть обусловлены высокой интенсивностью ПОЛ в легочной ткани с увеличением содержания малонового диальдегида в 2,9 раз [Z = -2,96; p = 0,003] и активностью процессов фосфолипазного гидролиза [Z = -3,58; p = 0,0001] с повреждением липидов сурфактанта свободными радикалами и лизосоединениями. Изменения водного баланса проявились увеличением кровенаполнения легких [Z = -2,61; p = 0,009]. При проведении гипоксических тренировок легочное кровенаполнение, напротив, уменьшалось [Z = -3,46; p = 0,001], что могло быть следствием гипоксической вазоконстрикции [9]. В условиях снижения эффективности перфузии в системе малого круга кровообращения изменялся метаболизм поверхностно-активных липидов с уменьшением фосфолипидной фракции [Z = -2,60; p = 0,009], снижением коэффициента ФЛ/ХЛ [Z = -3,05; p = 0,002], на фоне высокой активности фосфолипазы. При этом поверхностно-активные свойства сурфактанта не были оптимальными, о чем свидетельствовало уменьшение индекса стабильности альвеол [Z = -2,39; p = 0,017]. При использовании режима раннего гипоксического прекондиционирования с целью нейропротекции летальность животных в ишемическом периоде оставалась высокой и достигла 39%, неврологический дефицит составил $8,0 \pm 1,0$ баллов. В водном балансе отличий от параметров при ишемии мозга не отмечалось, сохранялось высокое кровенаполнение легких [Z = -0,71; p₁ = 0,48]. В системе сурфактанта наблюдали значительное повышение активности фосфолипазы А2 [Z = -3,48; p = 0,001], при этом фракционный состав липидов не отличался от контроля. Как и в опыте с ишемией мозга минимальное поверхностное натяжение смывов увеличилось [Z = -3,00; p = 0,003], позитивным фактором явилась оптимизация индекса стабильности альвеол [Z = -2,85; p₁ = 0,004]. Возможно, это обусловлено некоторым уменьшением интенсивности свободно-радикальных реакций в легочной ткани по сравнению с опытной группой [Z = -2,88; p₁ = 0,004], однако уровень МДА оставался существенно выше контрольных величин [Z = -3,05; p = 0,002]. Кроме того, наряду со снижением активности ПОЛ уменьшилась и активность каталазы [Z = -3,16; p₁ = 0,002]. В условиях применения режима позднего гипоксического прекондиционирования летальность животных не снизилась и составила 40%, неврологический дефицит был равен $8,1 \pm 1,3$ баллам. Анализ параметров системы сурфактанта показал, что его липидный состав, соотношение ключевых фракций – ФЛ/ХЛ не отличались от контроля, активность фосфолипазы А2, как и при ишемии мозга, и в условиях раннего прекондиционирования была высокой [Z = -2,65; p = 0,008], [Z = -2,31; p₁ = 0,021]. Позитивных изменений свойств сурфактанта не отмечалось, ПН минимальное и индекс стабильности альвеол соответствовали параметрам у животных с окклюзией сонных артерий. Однако интенсивность ПОЛ в легочной ткани, как и в условиях раннего прекондиционирования уменьшалась [Z = -2,88; p₁ = 0,004] наряду со снижением активности каталазы [Z = -3,39; p₂ =

0,004]. Особенностью изменения баланса жидкости в легочной ткани явилось уменьшение органного кровенаполнения [$Z = -2,67$; $p_2 = 0,008$], что соответствовало значениям, выявленным в условиях гипоксических тренировок - [$Z = -0,57$; $p_2 = 0,569$]. Содержание общей и экстраваскулярной жидкости не отличались от контрольных величин. Установлено, что в основе протекторного действия прекондиционирования лежит активация транскрипционных факторов (NFkB, JNK, HIF-1), повышение активности систем утилизации кислорода в структурах мозга, синтез ростовых и нейротрофических факторов, снижение эксайтотоксичности глутамата [5]. Вместе с тем, применение гипоксического прекондиционирования, оказывая общее воздействие на организм, усиливает реактивность гипофизарно-адренокортиkalной системы, повышает уровень гормонов стресса [10]. Не исключено, что под их влиянием активируется катаболизм липидов сурфактанта, на что указывают корреляционные связи между содержанием фосфолипидов и активностью фосфолипазы ($r_s = -0,90$; $p < 0,01$). Подобные изменения метаболизма легочного сурфактанта были описаны при хронической физической нагрузке, что, по мнению авторов, было связано с повышенным расходом сурфактанта в условиях гипервентиляции, а также усиленным его катаболизмом [11].

Заключение. Гипоксическое прекондиционирование, независимо от режима его применения, не обеспечивает коррекции дизрегуляционных расстройств сурфактанта и водного баланса легких, индуцированных ишемией головного мозга. В условиях прекондиционирования снижается прооксидантная активность легочной ткани на фоне уменьшения активности каталазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сон А. С., Солодовников Ю. А. Характер вегетативных расстройств в остром периоде ишемического инсульта // Международный неврологический журнал. – 2010. – № 7 (37). – С. 98–104.
2. Sarkar S., Chakraborty D., Bhowmik A. Ghosh M.K. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities // Front Biosci (Landmark Ed). – 2019. – Vol. 1, no. 24. – P. 435–450.
3. Salim A., Martin M., Brown C. 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. – Vol. 39, no. 1. – P. 30–35.
4. Лукина С. А., Тимофеева М. Р., Волкова Е. В., Трушникова Р. В. Метаболические функции легких при десятидневной неполной глобальной ишемии мозга в

эксперименте // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2014. – Том 13. – № 3 (51). – С. 68–73.

5. Чефранова Ж. Ю., Яценко Е. А., Лысых Е. А., Капустина З. А. Феномен прекондиционирования в аспектах ишемического повреждения головного мозга// Медицина – 2019. – № 1. – С. 109–122.
6. Щербак Н. С., Галагудза М. М. Экспериментальные модели ишемического инсульта // Экспериментальная медицина. – 2011. – № 1. – С. 39–46.
7. Вычужанова Е. А. Влияние гипоксического прекондиционирования на показатели стресс-реакции у крыс // Вопросы науки: Естественно-научные исследования и технический прогресс. – 2014. – № 4 (11). – С. 70–74.
8. Морковин Е. И., Куркин Д. В., Тюренков И. Н. Оценка психоневрологического дефицита у грызунов: основные методы // Обзоры, теоретические и дискуссионные статьи. – 2018. – Т. 68, № 1. – С. 3–15.
9. Бережанская С. Б., Тодорова А. С., Лукьянова Е. А. Роль оксилипинов в формировании эндотелиальной дисфункции и нарушений гемостаза при перинатальной патологии // Педиатрия. – 2011. – Т. 90, № 1. – С. 137–141.
10. Рыбникова Е. А., Миронова В. И., Пивина С. Г., Ордян Н. Э., Тюлькова Е. И., Самойлов М. О. Гормональные механизмы гипоксического прекондиционирования у крыс // Физиология. Доклады Академии наук. – 2008. – Т. 421, № 5. – С. 713–715.
11. Султанова Т. С. Характеристика изменений и качества сурфактанта легких после хронической физической нагрузки // Азербайджанский медицинский журнал. – 2023. – № 1. – С. 152–158.