

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ АЭРОСТАЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ



Хайбуллина Зарина Руслановна¹, Исаков Пулатжон Махмуджонович²

1 - Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр хирургии имени академика В. Вахидова, Республика Узбекистан, г. Ташкент;

2 - Андижанский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Андижан

ТАЖРИБАДА АЭРОСТАЗНИНГ ТУРЛИ УСУЛЛАРИДА ЛИПОПЕРОКСИДЛАНИШ ИНТЕНСИВЛИГИНИ ҚИЁСИЙ БАҲОЛАШ

Хайбуллина Зарина Руслановна¹, Исаков Пулатжон Махмуджонович²

1 – Академик В.Вахидов номидаги республика ихтисослаштирилган хирургия илмий-амалий тиббиёт маркази, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент ш.;

2 – Андижон давлат тиббиёт институти, Ўзбекистон Республикаси, Андижон ш.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE INTENSITY OF LIPOPEROXIDATION IN VARIOUS METHODS OF AEROSTASIS IN THE EXPERIMENT

Khaibullina Zarina Ruslanovna¹, Isakov Pulatjon Makhmudjonovich²

1 - Republican specialized scientific and practical medical center for surgery named after academician V. Vakhidov, Republic of Uzbekistan, Tashkent;

2 - Andijan State Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Andijan

e-mail: dr.alohanov@gmail.com

Резюме. Ўпка паренхимаси шикастланганда гемостаз ва аэростази таъминлаш учун биологик елим ва тўқима ичидаги гелни қўллашда липопероксидланиш интенсивлиги ва мембранани бузувчи жараёнларнинг зўравонлигини баҳолаш билан бир қатор экспериментал тадқиқотлар ўтказилди. Тажрибада ўткир ўпка шикастланиши ва гемо-аэростазнинг турли даврларида реактив кислород турларининг ҳосил бўлиш даражасини турли усуллар билан ўрганиш шуни кўрсатдики, биологик елимдан фойдаланганда каталаза фаоллигининг ишончли ингибацияси фонида кузатувнинг 1 кундан 7 кунгача статистик жиҳатдан сезиларли даражада ошган, Хемобен гелидан фойдаланганда эса ўсиш ва ушбу кўрсаткичларнинг 7 кунга нормаллашиши тажриба қайд этилган. Бу яллигланишнинг экссудатив фазасини ҳал қилиш ва фиброз-пролифератив фазага ўтишни, сўнгра ўпка функцияларининг тўлиқ тикланишини кўрсатади.

Калим сўзлар: Липопероксидация, аэростаз, биологик елим.

Abstract. A series of experimental studies has been conducted to assess the intensity of lipoperoxidation and the severity of membrane-destructive processes when using biological glue and interstitial gel administration to ensure hemostasis and aerostasis in case of damage to the lung parenchyma. The study of the level of generation of reactive oxygen species at various times of acute pulmonary injury and hemo-aerostasis in various ways in the experiment showed that when using biological glue, the concentration of low-grade dialdehyde increased statistically significantly from 1 to 7 days of observation against the background of a significant inhibition of catalase activity, whereas when using Chemoben gel, an increase was noted normalization of these indicators by 7 days an experiment. This indicates the resolution of the exudative phase of inflammation and the transition to the fibrous-proliferative phase, followed by a full restoration of pulmonary functions.

Keywords. Lipid peroxidation, aerostasis, biological glue.

Актуальность проблемы. Длительная утечка воздуха (ДУВ) после вмешательств на лёгких остаётся одной из актуальных проблем торакальной хирургии [4]. Различные предложенные методы профилактики и лечения ДУВ имеют как

свои преимущества, так и недостатки. Дренирование плевральной полости при возникновении ДУВ приводит к удлинению сроков нахождения пациентов в стационаре и их последующему длительному амбулаторному наблюдению, требует

постоянного контроля отрицательного давления в системе и уходу за дренажами [8]. Применение сшивающих аппаратов даже с двойным прошиванием в экспериментальных и клинических исследованиях не обеспечивает полной герметизации культи бронха и легочной ткани, т.к. утечка воздуха возникает из линии степлерных швов. В связи с чем некоторые авторы предлагают дополнительно укреплять линию швов различными синтетическими или биологическими материалами [14]. Несмотря на обнадеживающие результаты исследований в применении различных герметиков, все они имеют определенные ограничения в виде развития абсцессов в легких, формирования спаечного процесса и прогрессирования воспаления, т.к. средства для гемо- и аэростаза являются инородными телами.

Перспективным средством для обеспечения аэро- и гемостаза является Хемобен, разработанный на основе окисленной целлюлозы.

Центральная роль в поддержании дыхательной функции легких принадлежит сурфактанту. Сурфактант (surface active agents) – липоротидный комплекс, который выстилает альвеолы, снижает поверхностное натяжение, увеличивает эластичность лёгких, предупреждает спадение альвеол на выдохе, участвует в иммунной защите, повышает активность альвеолярных макрофагов, препятствует проникновению воды в альвеолы (противоотечный барьер) [7,15]. На фоне острой гипоксии, развивающейся при пульмонэктомии, в динамике происходят значительные изменения количественного содержания и качественного соотношения индивидуальных фракций фосфолипидов (ФЛ), имеющих направленность на значительное повышение уровня токсичного лизофосфатидилхолина (ЛФХ), снижения количества легкоокисляемых ФЛ, снижение микровязкости липидного бислоя и увеличение «жесткости» мембраны [5].

Оценка интенсивности липопероксидации и выраженности мембранодеструктивных процессов может быть полезна при определении эффективности и безопасности способов гемостаза и аэростаза при оперативных вмешательствах на лёгких.

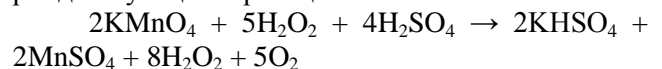
Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования выполнены в лаборатории экспериментальной хирургии ГУ «РСНПМЦХ имени акад. В.Вахидова» в 2022-2023 гг. Для оценки эффективности аэростаза, реакции тканей на внутритканевое введение геля Хемобен и время его рассасывания, были проведены исследования на белых беспородных крысах самцах весом 250-280 г. Под общей анестезией парами севофлорана крыса укладывалась на манипуляционный столик в положении лежа на животе с разведенными и фиксированными конечностями.

После обработки места вкола 70% раствором спирта производилась пункция правой плевральной полости с повреждением ткани легкого, которое определялось путем поступления воздуха в шприц. Через иглу вводился гель Хемобен в 3,3% концентрации в количестве 0,1 мл. Далее игла извлекалась. Область прокола обрабатывалась раствором бетадина.

Забор биоматериала проводили через 1 час и на 1, 3, 5 и 7 сутки после введения геля Хемобен (2-я опытная группа), группу сравнения составили крысы, у которых аэростаз достигался нанесением биологического клея на поверхность повреждённого лёгкого (1-я опытная группа). На каждом сроке наблюдения в каждой группе было по 6 крыс, контролем служили интактные крысы без повреждения легких.

После вскрытия грудной клетки крыс лёгкие отмывали от крови путём перфузии охлаждённого раствора 0,86% NaCl в течение 3-4 минут, затем промывали охлаждённым раствором 0,125М KCl в течение 2-3 мин под давлением 30 см вод.ст., после перфузии ткань лёгкого взвешивали и готовили гомогенат путем разрушения клеток в стеклянном гомогенизаторе Поттера – Элвехейма (1000 об/мин - 5 циклов) при соотношении среды выделения к объёму ткани легких 4:1. Среда выделения для определения МДА, активности каталазы, общего белка состояла из 0,125М KCl.

Определение МДА в гомогенате ткани лёгких проводили с тиобарбитуровой кислотой по методу Стальной И.Д. и соавт. Метод основан на взаимодействии 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК) с продуктом ПОЛ – МДА при высокой температуре в кислой среде с образованием окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при 532 нм. Активность каталазы в гомогенате легких исследовали по С.М. Зубковой и соавт. перманганатометрическим способом [3]. В основе метода лежит определение количества перекиси водорода, разложенной ферментом за период инкубации в реакции:



Активность фермента выражали с помощью каталазного числа – ммоль H_2O_2 / мг белка. Экстракцию общих липидов проводили по Фолчу с рекомендациями М. Кейтс [11]. Общий липидный экстракт (ОЛЭ) использовали для измерения количества общих липидов и фракционирования фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии. Количественное определение общих фосфолипидов и их фракций в тотальном гомогенате легких. О количестве общих фосфолипидов и их отдельных фракций судили по содержанию фосфора в них, который определяли после минерализации образ-

цов общих липидов и их фракций, с последующим колориметрическим измерением количества неорганического фосфора по реакции с реагентом Васьковского.

Результаты и их обсуждение. Интенсивность липопероксидации оценивали по содержанию легкоокисляемых фосфолипидов: суммы молярной доли фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола (ФС+ФИ), по соотношению фосфатидилхолина к сфингомиелину (ФХ/СФМ), по соотношению кислых фосфолипидов к нейтральным (К/Н), к кислым фосфолипидам (ФЛ) относили ФС, ФИ, фосфатидную кислоту (ФК), кардиолипин (КЛ), к нейтральным – ФХ, СФМ, фосфатидилэтаноламин (ФЭА).

Как показали наши наблюдения, в 1 опытной группе (О1) доля легкоокисляемых ФС и ФИ была снижена во все сроки наблюдения, что указывает на их деградацию, которая превышала скорость синтеза. При использовании биологического клея соотношение ФХ к СФМ было достоверно снижено в 1,4; 3,6; 2,2 и 1,7 раза относительно контроля на 1, 3, 5 и 7 сутки наблюдения соответственно ($p < 0,05$). Это указывает на дисбаланс ФЛ состава системы сурфактанта - повышение жёсткости, снижение эластичности сурфактанта за счет повышения в его составе СФМ и снижения ФХ, обеспечивающего поверхностно-активные свойства, которые не восстанавливались до 7 суток наблюдения. Соотношение нейтральных к кислым ФЛ (К/Н) также было изменено при использовании биологического клея в сторону понижения, что указывает на нарушение физико-

химических свойств мембранных компонентов лёгочных тканей, а также сурфактанта. В динамике острого легочного повреждения эти изменения имели тенденцию к некоторому улучшению, однако не достигали контрольных показателей на 7 сутки эксперимента.

При использовании геля Хемобен соотношение ФХ/СФМ было снижено на 1-3 сутки эксперимента ($p < 0,05$), после чего оно становилось сравнимым с контролем за счет баланса синтеза ФХ, что является значимым для поверхностно-активных свойств сурфактанта. Доля легкоокисляемых ФЛ достоверно изменялась на 3 сутки наблюдения, на высоте воспалительных изменений в лёгочных тканях, в последующем этот параметр был сравним с контролем ($p < 0,05$), что указывает на низкий уровень липопероксидации при использовании геля Хемобен относительно применения биологического клея (табл. 1).

При использовании биологического клея понижение легкоокисляемых фракций ФЛ (ЛОФ) – ФС+ФИ было в 1,2-3,4 раза относительно контроля на фоне увеличения ЛФХ, что указывает на перекисное окисление ФЛ под действием АФК, что приводит к потере мембранной асимметрии. Как известно, основу наружного монослоя клеточных мембран составляют ФХ и СФМ, ФК а внутреннего – ФЭА, ФС и холестерин, при окислительной модификации и снижении ФХ компенсаторно увеличивается доля СФМ, а экстернализация ФС в наружный монослой запускает апоптотическую деградацию клетки и ее гибель [9,13].

Таблица 1. Интенсивность липопероксидации при различных способах аэростаза

Индексы	К/Н	ФС+ФИ	ФХ/СФМ
Контроль	3,64 ± 0,11	5,18 ± 0,12	9,74 ± 0,22
О1-1ч	2,67 ± 0,13*	5,17 ± 0,09	9,14 ± 0,34
О2-1ч	2,99 ± 0,13*	5,17 ± 0,11	9,26 ± 0,23
О1-1 сут	2,07 ± 0,12*	4,3 ± 0,10*	6,94 ± 0,23*
О2-1 сут	2,67 ± 0,15*	4,84 ± 0,09	7,25 ± 0,19*
О1-3 сут	1,93 ± 0,14*	1,5 ± 0,11*	2,68 ± 0,19*
О2-3 сут	3,21 ± 0,16	4,68 ± 0,08*	7,05 ± 0,18*
О1-5 сут	2,43 ± 0,11*	3,14 ± 0,13*	4,33 ± 0,21*
О2-5 сут	2,84 ± 0,13*	5,3 ± 0,11	8,30 ± 0,24
О1-7 сут	2,69 ± 0,17*	3,77 ± 0,12*	5,77 ± 0,23*
О2-7 сут	4,09 ± 0,13*	5,25 ± 0,11	9,91 ± 0,22

Примечание: *- статистически значимо по отношению к контролю при $p < 0,05$

Таблица 2. Содержание МДА (нмоль/мг белка x мин) в тканях лёгких при различных способах аэростаза

Группа	1ч	1 сут	3 сут	5 сут	7 сут
Контроль			5,53 ± 0,08		
О1	5,77 ± 0,11	6,11 ± 0,05	8,56 ± 0,06	7,82 ± 0,07	7,66 ± 0,06
О2	5,97 ± 0,28	6,20 ± 0,08	7,51 ± 0,06	6,12 ± 0,04	5,76 ± 0,15
Р К:О1	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Р К:О2	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05
Р О1:О2	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,05

Таблица 3. Активность каталазы (ммоль H_2O_2 /мг белка) в тканях легких при введении геля Хемобен

Группа	1ч	1 сут	3 сут	5 сут	7 сут
Контроль	29,8 ±0,5				
O1	36,8 ±0,9	15,2 ±0,3	17,1 ±0,6	16,9 ±0,4	18,0 ±0,7
O2	35,2 ±0,9	35,9 ±0,5	37,1 ±0,4	31,9 ±0,4	28,0 ±0,4
P K:O1	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
P K:O2	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05
P O1:O2	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Мы полагаем, что в процессе аутолиза усиливается гидролиз ФЛ - ФЭА и ФХ, что способствует трансацилазным перестройкам в системе ФЛ-ДГ-ТГ, а также стимулируются трансферазные превращения в системах ФЭА→ФС, ФХ→СФМ и ФЭА→ФХ, ФХ→СФМ.

Обсуждая эти результаты отметим, что увеличение ЛФХ нарушает поверхностно-активные свойства сурфактанта, а изменения ФЛ состава клеток лёгочной ткани нарушает их функциональную активность, что проявляется в снижении синтеза сурфактанта [7, 10, 12]. Сурфактант в норме стимулирует альвеолярные макрофаги (АМ), предотвращая фиброзирование, но при дефиците сурфактанта этого не происходит и прогрессирует фибротический процесс [1, 9]. Дефицит сурфактанта способствует усилению пролиферации, увеличению фибробластов, что и проявилось морфологически в наших исследованиях в увеличении грануляционной ткани на 5 сутки наблюдения, подтверждая биохимические изменения.

Выявленные изменения ФЛ состава на модели аэростаза при остром легочном повреждении обусловлены снижением превращений ФЭА в ФХ и ФС в реакциях трансметилирования и обмена этаноламина на серин соответственно. Снижение ФХ может быть обусловлено также его окислением в ЛФХ, а также трансформацией в СФМ.

Исследование уровня мембрано-деструктивных процессов в лёгочной ткани, активности фермента АОС, а также фосфолипидного состава лёгких в опытной группе, где был применен аэростаз при помощи введения геля Хемобена инъекционно, показало результат лучше, по сравнению с применением биологического клея. Концентрация МДА нормализовывалась на 7 сутки эксперимента (табл.2), а повышение МДА на 1-3 сутки мы считаем закономерным для ответной реакции на острое лёгочное повреждение; снижение уровня МДА на 5 сутки и нормализация на 7 сутки указывает на разрешение экссудативной фазы воспаления и переход в фиброзно-пролиферативную фазу с последующим полноценным восстановлением лёгочных функций, что подтверждено морфологическими исследованиями.

Активность каталазы при введении геля Хемобен достоверно изменялась в сторону увели-

чения на 1-3 сутки ($p < 0,05$), что является компенсаторно-приспособительной реакцией мобилизации антиоксидантной системы с перераспределением ее активности в пользу поражённого органа. Нормализация активности каталазы происходила к 5 суткам наблюдения, когда она достоверно не отличалась от контроля ($p > 0,05$) (табл. 3).

Применение Хемобена в виде геля инъекционно привело к активации ПОЛ на 3 сутки эксперимента, которая в динамике снижалась к 7 суткам наблюдения, что способствовало восстановлению ФЛ спектра лёгочной ткани к этому сроку, и, соответственно к восстановлению физико-химических свойств сурфактанта. Физико-химические свойства сурфактанта зависят от его состава: ФЛ с низкой поверхностной активностью (СФМ, ФЭА, ФС, ФИ) присутствуют в составе сурфактанта в низких концентрациях, а монослой, состоящий из смеси ФХ и ФК, из-за более низкой температуры плавления переходит в гипофазу, облегчая формирование насыщенного слоя ДПФХ на границе раздела фаз воздух-жидкость [2,6]. Как видно из полученных результатов, применение Хемобена в виде геля инъекционно не приводит к избыточной активации воспалительной реакции в лёгочной ткани, изменения ФЛ спектра лёгочных тканей нормализуются на 7 сутки эксперимента на фоне восстановления активности каталазы и стационарно низкого уровня липопероксидации, сравнимого с контролем, что обеспечивает предпосылки для адекватных поверхностно-активных свойств лёгочного сурфактанта, а также оптимального структурно-функционального состояния клеток лёгочных тканей, подтверждённого морфологически.

Выводы. Изучение уровня генерации активных форм кислорода и активности фермента АОС в различные сроки острого легочного повреждения и гемо-аэростаза различными способами в эксперименте показало следующее. Уровень генерации АФК при сравниваемых способах аэростаза имел разнонаправленные изменения: при использовании биологического клея концентрация МДА увеличивалась статистически значимо с 1 до 7 суток наблюдения (в 1,4-1,5 раза, $p < 0,05$) на фоне достоверного угнетения активности каталазы в 1,7-1,9 раз, тогда как при использовании геля Хемобен увеличение МДА было на 1-3 сутки наблюдения в 1,36 раз, снижаясь в ди-

намике и достоверно не отличалось от контроля на 7 сутки эксперимента ($p < 0,05$) на фоне компенсаторного повышения активности каталазы, что указывает на разрешение экссудативной фазы воспаления и переход в фиброзно-пролиферативную фазу с последующим полноценным восстановлением лёгочных функций.

При применении геля Хемобена инъекционно доля легкоокисляемых ФЛ (ФС+ФИ) и соотношение ФХ/СФМ достоверно не отличалась от контроля на 5 сутки наблюдения, указывая на восстановление физико-химических свойств легочного сурфактанта и мембранных компонентов клеток легочных тканей, обеспечивая предпосылки для адекватных поверхностно-активных свойств лёгочного сурфактанта, а также оптимального структурно-функционального состояния клеток лёгочных тканей, подтверждённого морфологически.

Литература:

1. Голохваст К.С., Чайка В.В. Альвеолярный макрофаг (краткий обзор) // Вестник новых медицинских технологий – 2011 т. Хviii, № 2 – с. 23.
2. Зленко Д.В., Красильников П.М. Молекулярное моделирование липидных бислоевых мембран // Компьютерные исследования и моделирование. – 2009. – Т. 1, № 4. – С. 423–436.
3. Зубкова С.М., Бах А.Н. Количественное определение активности каталазы крови // Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. – М.: Медицина, 1976. – С. 81-83.
4. Иозефи К.Д. и др. Оптимальное лечение длительной утечки воздуха после резекций легкого по поводу рака // Южно-российский онкологический журнал . 2023. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/optimalnoe-lechenie-dlitelnoy-utechki-vozduha-posle-rezektisyi-legkogo-ro-povodu-raka> (дата обращения: 04.12.2023).
5. Калиева К.Д. Обмен липидов, статус перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы на фоне острой гипоксии при введении ноотропов: Экспериментальное исследование // Автореф. ...д.б.н., Актобе.- 2002, 43с.
6. Кузнецов В.И., и др. Липиды в структуре и функционировании биологических мембран (Обзор) // Саратовский научно-медицинский журнал.- 2014; 10(2): 262–266.
7. Al-Saedy M., et al dysfunction of pulmonary surfactant mediated by phospholipid oxidation is cholesterol-depended // Biomedica et /biophysica Acta .-2018.-№4.-P.1040-1049.
8. Aprile V, Vacchin D, Calabrò F, et al. Intraoperative prevention and conservative management of postoperative prolonged air leak after lung resection: a systematic review. J Thorac Dis 2023;15:878-92.

9. Farber DL, Sims PA. Dissecting lung development and fibrosis at single-cell resolution // Genome Med. 2019 May 24;11(1):33. doi: 10.1186/s13073-019-0645-7. PMID: 31126351.

10. Finkielstein C.V., Overduin M., Capelluto D.G. Cell migration and signaling specificity is determined by the phosphatidylserine recognition motif of Rac1 // J. Biol. Chem.- 2006.-№ 281.-P. 27317–27326.

11. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J Biol Chem.-1957.- № 226.- P. 497–509.

12. Knudsen L., Ochs M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components // Histochem. Cell Biol.- 2018. Vol.150, №6. P.661–676. doi: 10.1007/s00418-018-1747-9.

13. Rodriguez-Cuenca S, Pellegrinelli V, Campbell M, Oresic M, Vidal-Puig A. Sphingolipids and glycerophospholipids – The “ying and yang” of lipotoxicity in metabolic diseases // Prog Lipid Res.- 2017.-№ 66.-P. 14-29.

14. Sadykov R.A., Ismailov B.A., Kim O.V. New hemostatic preparation made of the cellulose derivatives. // Journal of life science and Biomedicine - Turkey, Volume 9, Issue 1, January 2019, P.19-25.

15. Tlatempa-Romero Beatriz, Verna Cázares-Ordoñez 2, Luis F. Oyarzábal 3 and Luis G. Vázquez-de-Lara The Role of Pulmonary Surfactant Phospholipids in Fibrotic Lung Diseases // Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 326. <https://doi.org/10.3390/ijms24010326>.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ АЭРОСТАЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Хайбуллина З.Р., Исаков П.М.

Резюме. Проведена серия экспериментальных исследований с оценкой интенсивности липопероксидации и выраженности мембранодеструктивных процессов при применении биологического клея и внутритканевого введения геля для обеспечения гемостаза и аэростаза при повреждении паренхимы легкого. Изучение уровня генерации активных форм кислорода в различные сроки острого легочного повреждения и гемо-аэростаза различными способами в эксперименте показало, что при использовании биологического клея концентрация малонового диальдегида увеличивалась статистически значимо с 1 до 7 суток наблюдения на фоне достоверного угнетения активности каталазы, тогда как при использовании геля Хемобен увеличение отмечена нормализация данных показателей к 7 суткам эксперимента. Это указывает на разрешение экссудативной фазы воспаления и переход в фиброзно-пролиферативную фазу с последующим полноценным восстановлением лёгочных функций.

Ключевые слова: Липопероксидация, аэрозтаз, биологический клей.