

В. А. Березовский, В. Ю. Горчаков, И. Н. Алексеева,
Е. О. Богомолец, И. В. Андрианова, Н. В. Макогон

Возможность направленных изменений поверхностной активности сурфактантов легкого крыс путем воздействия специфическими к ним антителами

Исследования проведены на 216 крысах линии Вистар массой 150—200 г. Антисурфактантные антитела получали иммунизацией кроликов трехкратным подкожным введением (комбинированно с полным и неполным адъювантом Фрейнда) очищенных сурфактантов легкого крыс. Показано, что специфические антитела являются активным фактором воздействия на поверхностную активность сурфактантов легкого и на функциональную активность секреторных клеток респираторных отделов легкого (по данным электронно-микроскопических исследований). Установлено, что малые дозы антисурфактантных антител (0,06 мкг белка на 100 г массы тела), введенные внутривенно трехкратно, стимулируют сурфактантную систему, а большие (3 мг белка на 100 г массы тела) — угнетают ее.

Введение

Поверхностно-активные вещества легкого — сурфактанты — представляют собой смесь фосфолипидов и белков, которые стабилизируют легочные альвеолы. Известно, что нарушение физиологического состояния сурфактантов легкого приводит к возникновению патологических процессов, неполноценности респираторных и метаболических функций органа. Поиск методов стимуляции синтеза и секреции сурфактантов является одной из актуальных задач экспериментальной и клинической медицины. Показано, что использование специальных диет, применение ряда биологически активных веществ и гормонов, адаптация к хронической гипоксии и ряд других методов позволяют стимулировать синтез сурфактантов в легком [2, 3, 6, 7, 15]. Вопрос об использовании стимулирующих доз специфических антител для активации синтеза сурфактантов легкого в доступной нам литературе не освещался, хотя принципиальная возможность такого воздействия вытекает из многочисленных данных направленного влияния противоорганных и противотканевых антител [1, 4, 5, 11, 12]. Интерес к антителам, специфическим к сурфактанту легкого, возрастает в связи с обнаружением при ряде заболеваний антител к различным фосфолипидам [10], а также с возможностью получения антифосфолипидных антител в эксперименте [16, 17].

Цель нашей работы — исследовать влияние различных доз специфических антител на поверхностную активность сурфактантов и ультраструктуру респираторных отделов легкого.

Методика

Исследования выполнены на 216 крысах линии Вистар массой 150—200 г и 18 кроликах породы шиншилла. Сурфактанты из ткани легкого крыс выделяли по Топака [18]. Ткань предварительно отмытого физиологическим раствором легкого измельчали ножницами до состояния кашицы с последующей обработкой в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Гомогенат заливали пятью объемами физиологического раствора, встряхивали на шутель-аппарате В-1 в течение

© В. А. БЕРЕЗОВСКИЙ, В. Ю. ГОРЧАКОВ, И. Н. АЛЕКСЕЕВА, Е. О. БОГОМОЛЕЦ,
И. В. АНДРИАНОВА, Н. В. МАКОГОН, 1991

10 мин,
300 г. Н
60 мин
растворе,
и центри
способом
Лоури.

Анти
трехкрат
тантов ко
Первая д
сурфакта
него введ
трех имм
тел в рез
антител
фракцию
Kendall
трольного
мальной
равном п

Изуч
антител
респирато

В 1-й
вену по 3
венно, но
2-й серия
дили на
Поверхно
гельми—
мальное
индекс с
ность. Ре
t Стюде

Ульт
микроско
форме, п
затем —
обезвожи
том. Из
окрашива
морфомет
тонкие, к
цитратом
и ЕМ-100

Результат

Проведен
ГАС (1-я
легкого
жению,
натяжени
ного нат
показател
влиянием
кого. Исп
мального,
свидетель

10 мин, после чего раствор центрифугировали в течение 15 мин при 300 g. Надосадочную жидкость повторно центрифугировали в течение 60 мин при 1000 g. Осадок ресуспендировали в физиологическом растворе, доводили плотность раствора хлористым натрием до 1,16 г/мл и центрифугировали в течение 30 мин при 1500 g. В выделенных таким способом сурфактантах определяли концентрацию белка по методу Лоури.

Антисурфактантные антитела получали иммунизацией кроликов трехкратным (с интервалом 7 и 14 сут) подкожным введением сурфактантов комбинированно с полным или неполным адъювантом Фрейнда. Первая доза антигена составляла 8, вторая и третья — 13 мг белка сурфактантов из расчета на 1 кг массы тела. Через 3 нед после последнего введения антигена животных обескровливали. Сыворотку крови от трех иммунизированных кроликов смешивали и определяли титр антител в реакции кольцепреципитации. Он составил 1 : 64 000. В качестве антител к сурфактантам легкого использовали гамма-глобулиновую фракцию антисурфактантной сыворотки (ГАС), полученную по методу Kendall [9]. Содержание белка в ГАС — 9,7 мг/мл. В качестве контрольного препарата использовали гамма-глобулиновую фракцию нормальной кроличьей сыворотки (ГНС). ГАС и ГНС вводили крысам в равном по содержанию белка количестве.

Изучено влияние больших (1-я серия) и малых (2-я серия) доз антител на поверхностную активность сурфактантов и ультраструктуру респираторных отделов легких у интактных животных.

В 1-й серии опытов крысам вводили ГАС 5 сут подряд в хвостовую вену по 3 мг/100 г, во 2-й — трехкратно интервалом 2 сут тоже внутривенно, но по 0,06 мкг/100 г. Животные, служившие контролем к 1-й и 2-й сериям, получали соответствующие дозы ГНС. Исследования проводили на следующие сутки после последнего введения препаратов. Поверхностную активность сурфактантов определяли методом Вильгельми—Лонгмюра [2], измеряя статическое, максимальное и минимальное поверхностное натяжение. По этим показателям рассчитывали индекс стабильности (ИС), характеризующий поверхностную активность. Результаты обрабатывали статистически с применением критерия t Стьюдента.

Ультраструктуру легкого оценивали по результатам электронной микроскопии. Кусочки легкого фиксировали сначала в 4 %-ном параформе, приготовленном на 0,1 моль/л фосфатном буфере (рН 7,2—7,4), затем — в 1 %-ном забуференном растворе четырехокси осмия, после обезвоживания в спиртах и ацетоне заключали в смесь эпона с аралдитом. Из каждого блока готовили полутонкие (1 мкм) срезы, которые окрашивали толуидиновым синим и использовали для ориентации и морфометрических исследований на тканевом уровне, а также ультратонкие, которые контрастировали водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе ЕМВ-100В и ЕМ-100В.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что после введения больших доз ГАС (1-я серия) снижается поверхностная активность сурфактантов легкого (таблица). Индекс стабильности (ИС) имел тенденцию к снижению, что связано с увеличением максимального поверхностного натяжения. При измерении минимального и статического поверхностного натяжения отмечена тенденция к повышению значения этого показателя. Полученные результаты дают основание полагать, что под влиянием больших доз ГАС уменьшается количество сурфактантов легкого. Использование контрольной ГНС приводило к снижению минимального, максимального и статического поверхностного натяжения, свидетельствующему о возможном возрастании количества сурфактан-

ии Вистар массой 150—
иммунизацией кроликов
рованно с полным и не-
фактантов легкого крыс.
ся активным фактором
фактантов легкого и на
ок респираторных отде-
ических исследований).
ных антител (0,06 мкг
енно трехкратно, стиму-
г белка на 100 г массы

урфактанты — представ-
которые стабилизируют
физиологического состоя-
овению патологических
етаболических функций
секреции сурфактантов
стальной и клинической
ных диет, применение
в, адаптация к хрони-
г стимулировать синтез
использовании стиму-
вации синтеза сурфак-
вещался, хотя принци-
ает из многочисленных
х и противотканевых
сифическим к сурфак-
ем при ряде заболева-
также с возможностью
менте [16, 17].

различных доз специ-
ость сурфактантов и

Вистар массой 150—
нты из ткани легкого
льно отмытого физио-
нидами до состояния
ном гомогенизаторе с
объемами физиологи-
арате В-1 в течение

Е. О. БОГОМОЛЕЦ,

журн. 1991. Т. 37. № 5

Вариант опыта	Поверхностное натяжение, мН/м			Индекс стабильности, отн. ед.
	статическое	максимальное	минимальное	
1-я серия				
Контроль (интактные животные)	40,6±1,5	46,4±1,0	22,1±0,5	0,730±0,038
ГАС	41,0±1,8	50,2±1,1*	24,8±1,0*	0,686±0,041
ГНС	37,6±1,2	41,3±0,9*	19,3±0,7*	0,723±0,039
2-я серия				
Контроль (интактные животные)	41,0±1,8	52,2±1,1	24,8±1,0	0,668±0,024
ГАС	43,0±1,6	52,5±1,4	19,3±1,5*	0,930±0,024*
ГНС	39,3±1,3	42,7±1,4*	28,0±0,9*	0,411±0,019*

тов на альвеолярной поверхности легкого. ИС при этом практически не изменялся. Все это дает основание считать, что наряду с увеличением количества сурфактантов на альвеолярной поверхности его интегральная поверхностная активность остается низкой.

Полученные результаты позволяют говорить о том, что специфические антитела, применяемые в больших дозах, снижают поверхностную активность сурфактантов легкого, в малых — стимулируют сурфактантную систему легкого.

После введения ГАС в малых дозах (2-я серия) в альвеолоцитах II типа отмечается активация митохондрий, набухание элементов эндоплазматического ретикулума, появление большого количества молодых соединительнотканых клеток и липофибробластов. В цистернах эндо-

R. E. Kavet
Academy of

	Индекс стабильности, отн. ед.
	$0,730 \pm 0,038$
*	$0,686 \pm 0,041$
*	$0,723 \pm 0,039$
	$0,668 \pm 0,024$
*	$0,930 \pm 0,024^*$
*	$0,411 \pm 0,019^*$

этом практически
наряду с увеличе-
ренности его инте-

я серия) показало,
ное натяжение на
детельствуют о ка-
сурфактантов, приво-
Введение ГНС в
натяжение и вызы-
свидетельствует об
рной поверхности.
я (на 13 %) дает
сурфактантов сни-
а 39 %.

том, что специфи-
ижают поверхност-
ых — стимулируют

казали, что после
х II типа появляет-
но расположенных
площадь цитоплаз-
аходится в состоя-
веол содержимого
оложенных гранул
пичием гомогенных
гранулы и зрелые
м или стохастичес-
ужены оптические
ембран, что может
остава. Эндотелий
ей и обилием про-
то свидетельствует
рукцию клеточных

) в альвеолоцитах
ие элементов эндо-
количества молодых
В цистернах эндо-

плазматического ретикулума наблюдается скопление мелких и средних лизосом. Во многих клетках прослеживаются маргинация хроматина ядра и повышение осmioфильности митохондрий. Гипертрофированные альвеолоциты II типа с большим разнообразием ламеллярных телец и увеличенным числом лизосом перемежались с тучными клетками, заполненными гранулами секрета. Совокупность приведенных результатов позволяет констатировать повышенную функциональную активность секреторных клеток респираторных отделов легкого под влиянием ГАС. При введении ГНС независимо от дозы выявлено усиление контактов клеток иммунного ряда: лимфоцит — макрофаг — плазматическая клетка.

Разнонаправленный эффект больших и малых доз антител к сурфактанту легкого подтверждает общую закономерность действия различных доз противотканевых антител [1, 4, 11, 12]. Механизм угнетающего действия специфических антител, примененных в больших дозах, на поверхностную активность сурфактантов легкого может быть связан с тем, что образовавшиеся иммунные комплексы антиген — антитело выводят из сферы функционирования белковые и фосфолипидные компоненты сурфактантов. В силу тесной связи сурфактантов с клетками легких, а также в виду возможного наличия перекрестно реагирующих антител в ГАС к клеточным антигенам, эти клетки подвергаются в разной мере деструкции, что в свою очередь может привести к ослаблению секреции сурфактантов и уменьшению их количества на альвеолярной поверхности. Стимулирующее действие антител, примененных в малых дозах, также может проявиться на уровне белковых и фосфолипидных молекул сурфактантов и на уровне клеток, их секретирующих. О действии антител на уровне белковой молекулы можно судить на основании данных литературы об усилении активности ферментов под влиянием специфических антител [13], что связывают с конформационными изменениями молекулы фермента. Представленные нами результаты электронно-микроскопических исследований свидетельствуют также о повышении функциональной активности клеток, секретирующих сурфактанты. Механизмы стимулирующего действия антител на клетки достаточно сложны и многообразны. Это могут быть и активация клеток, начинающаяся на мембране при фиксации на ней антител [8], и стимулирующее действие продуктов распада клеток после их незначительного повреждения антителами [4].

Таким образом, проведенные исследования показали, что специфические антитела являются активным фактором воздействия на свойства сурфактантов легкого, а также на функциональную активность клеток, его синтезирующих. Они свидетельствуют также о том, что малые дозы антисурфактантных антител могут быть использованы для стимуляции сниженной по тем или иным причинам поверхностной активности сурфактантов легкого.

V. A. Berezovsky, V. Yu. Gorchakov, I. N. Alekseyeva,
E. O. Bogomoletz, I. V. Andrianova, N. V. Makagon

POSSIBILITY OF DIRECTED CHANGES IN THE SUPERFICIAL ACTIVITY OF RAT LUNG SURFACTANTS UNDER THE INFLUENCES OF ANTIBODIES SPECIFIC TO THEM

The experiments were performed on Wistar rats with weight of 150-200 g. Antibodies were prepared by immunization of rabbits with pure surfactants of rat lungs and were intravenously injected into rats three times within 3 days intervals. These antibodies were shown to influence the superficial activity of lung surfactants and the alveolar lung cells activity. The low doses of antibodies (0.06 µg of protein per 100 g of body mass) stimulated the superficial activity of lung surfactants, while higher doses (3 mg of protein per 100 g of body mass) inhibited it.

R. E. Kavetsky Institute of Oncology Problems,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева И. Н. Противопеченочные антитела и функции печени.— Киев : Наук. думка.— 1980.— 182 с.
2. Березовский В. А., Горчаков В. Ю. Поверхностно активные вещества легкого.— Киев : Наук. думка, 1982.— 165 с.
3. Биркун А. А., Нестеров Е. Н., Кобозев Г. В. Сурфактанты легких.— Киев : Здоровье.— 1981.— 160 с.
4. Богомолец О. О. Специфічна цитотоксична стимуляція і блокада клітинних функцій // Мед. журн.— 1935.— 4, Вип. 3/4.— С. 447—456.
5. Богомолец Е. О. Влияние антиретикулярной сыворотки на постгипоксическую реакцию ткани легкого и миокарда // Актуальные проблемы современной патофизиологии.— Киев : Наук. думка, 1981.— С. 56—57.
6. Горчаков В. Ю., Булат И. А. Сезонные изменения поверхностной активности сурфактантов легкого // Физиол. журн.— 1987.— 33, № 3.— С. 86—89.
7. Горчаков В. Ю., Коросташ Т. Г. Изменения сурфактантов легкого при гипоксии // Сурфактанты легкого в норме и патологии.— Киев : Наук. думка, 1983.— С. 120—124.
8. Гуцин И. С. Немедленная аллергия клетки.— М. : Медицина.— 1976.— 174 с.
9. Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия.— М. : Медицина, 1968.— 684 с.
10. Насонов Е. А. Антифосфолипидный синдром: клиническая и иммунологическая характеристика // Клин. медицина.— 1989.— № 1.— С. 5—13.
11. Спасокукоцкий Ю. А., Ильевич Н. В., Барченко Л. И. и др. Действие специфических сывороток на половые железы.— Киев : Наук. думка.— 1977.— 216 с.
12. Федоров М. А., Владос Х. Х., Раушенбах М. О. и др. Экспериментально-клинические материалы по исследованию новых цитотоксических сывороток.— М. : Медгиз.— 1955.— 209 с.
13. Шатаева Л. К., Заикина Н. А. О действии на каталазу иммунных и нормальных сывороток // Вopr. мед. химии.— 1975.— 21, № 3.— С. 258—263.
14. Enhorning G. Isoxuprine-induced release of pulmonary surfactant in the raddit // Amer. J. Obstetr. and Gynecol.— 1976.— 129, N 2.— P. 197—202.
15. Liley H. S., White R. F., Benson B. J., Ballard P. L. Glucocorticoid both stimulate and inhibit production of pulmonary surfactant protein in fetal human lung // Proc. Nat. Acad. Sci.— 1988.— 85.— P. 9096—9100.
16. Maneta-Peyret L., Bessule J. J., Safard H., Cassaghe C. Demonstration of high specificity antibodies against phosphatidylserine // J. Immunology Meth.— 1988.— N 2.— P. 123—127.
17. Rauch J., Weng Q-H., Tannenbaum H. Lupus anticoagulant and platelet properties of human hybridoma autoantibodies // J. Immunology.— 1987.— 139, N 8.— P. 2598—2604.
18. TanaKa G. Comparison of surfactants prepared from lungs of calf, ox, bog and rabbit // Chem. and Pharm. Bull.— 1983.— 31, N 11.— P. 4101—4115.

Ин-т проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого
АН УССР, Киев

Материал поступил
в редакцию 11.08.90

УДК 616.24—001

М. М. Середенко, Т. Д. Миняйленко, Э. Б. Великанов,
А. В. Карякин, А. А. Резаев

Влияние дыхания смесью воздуха с промышленным природным газом, содержащим сероводород, на гликолиз и перекисное окисление липидов у крыс

Показано, что дыхание смесью воздуха с природным газом, содержание сероводорода в котором повышено, приводит у крыс к ингибированию перекисного окисления липидов, а также увеличению концентрации молочной кислоты и отношения концентраций молочной и пировиноградной кислот. Наличие в атмосферном воздухе сероводорода вызывает угнетение перекисного окисления липидов и анаэробного гликолиза.

© М. М. СЕРЕДЕНКО, Т. Д. МИНЯЙЛЕНКО, Э. Б. ВЕЛИКАНОВ, А. В. КАРЯКИН,
А. А. РЕЗАЕВ, 1991

Введение

Освоение
нием сер
мышленн
личных в
которые
бодно-ра
тили раб
нашей р
щего сер

Методика

Исследов
250 г. Ж
жении 2
состава,
дышали
промышл
(ППГАМ
смесью в
600 мг/м
сероводор
в которы
ППГАМ,
Для
животных
молочной
этих кис
(ПОЛ)
гидропер
нового д
«Серва»
фотометр
обработы

Результат

Представ
хание кр
концентр
гликолиз
достовер
в дыхате
лочной к
о развит
ние «изб
нию с ко
ты. Иным
что обяза
всего мен
кислоты,
ле трикар
навливал
рой изуч
углекисло
рост кон
положить
связано с
опытов, в