

В. Я. Березовський, О. О. Богомолець, В. Ю. Горчаков,
М. В. Палагіна, І. А. Хасабова, М. А. Хасіна

Вплив інгаляції поверхнево-активних речовин на стан сурфактантної системи легень

Изучали поверхностную активность, биохимический состав и морфологию легких крыс в норме, при действии острой гипоксии и введении обзидана. При действии обзидана и гипоксии, отмечены снижение индекса стабильности сурфактантов, уменьшение содержания фосфатидилхолина и появление во фракции фосфолипидов лизофосфатидилхолина и лизофосфатидилэтаноламина. Ингаляция крысам сурфактантов, выделенных из легких свиней, привела к восстановлению поверхностной активности, повышению содержания фосфатидилхолина в составе сурфактантов и исчезновению лизофосфатидилхолина и лизофосфатидилэтаноламина. Однако ингаляция экзогенного сурфактанта не устраняла морфологических нарушений в легком, вызванных гипоксией и введением обзидана.

Вступ

Показано, що порушення синтезу або секреції сурфактантів може бути одним з чинників розвитку бронхолегеневої патології, а різноманітні захворювання легень знижують поверхневу активність сурфактантів, збільшуючи важкість основного процесу [3, 4]. Розробка методів корекції поверхневої активності сурфактантів — одна з актуальніших задач експериментальної медицини. Відомі спроби впливу на сурфактантну систему за допомогою фармакологічних препаратів [6], харчових речовин, які вміщують проміжні продукти обміну сурфактантів [7]. Реалізація впливу відбувається протягом кількох діб або неділь. Ургентна корекція стану сурфактантів може бути відтворена інгаляційним введенням поверхневоактивних речовин (ПАР) біологічного походження. Такий метод дозволяє швидко запобігти дефектів структури і функції моношару ПАР на альвеолярній поверхні і на деякий час полегшити секреторне навантаження великих альвеолярних клітин.

Для оцінки ефективності інгаляції ПАР необхідно попередньо визвати порушення сурфактантної системи, тому нами був використаний метод функціональної депресії сурфактантної системи легень гострою гіпоксичною гіпоксією [2] і (або) частковою денервацією легень фармакологічними препаратами [5]. Тому метою цієї роботи є дослідити вплив інгаляції ПАР, здобутих з легень свині, на поверхневу активність сурфактантів і ультраструктуру респіраторних відділів легень після впливу гострої гіпоксичної гіпоксії і блокади адренорецепторів.

Методика

Досліди провадили на щурах-самцях масою 150—200 г, які були поділені на п'ять груп: I — інтактні тварини; II — тварини, піддані дії гострої гіпоксичної гіпоксії шляхом «підняття» в барокамері на висоту 9 000 м н.р.м. на 2 год (тварин декапітували через 2 год після «спуску»); III — тварини, що отримували обзидан (1 мг/100 г); IV — тварини, що отримували обзидан після «спуску» з висоти 9 000 м (тварин декапітували через 2 год після «спуску» і введення обзидану); V — тварини отримували те, що в IV, але після введення обзидану тваринам провадили ультразвукову інгаляцію 10 %-вого розчину ПАР легень свині протягом 20 хв.

Для фізико-хімічного дослідження сурфактанти здобували з тканини легень (50 мг). Активність сурфактантів розраховували за значенням максимального і мінімального поверхневого натягу [3]. Для біохімічного дослідження сурфактанти здобували з тканини легень (1,5—2,0), яку подрібнювали ножицями до стану

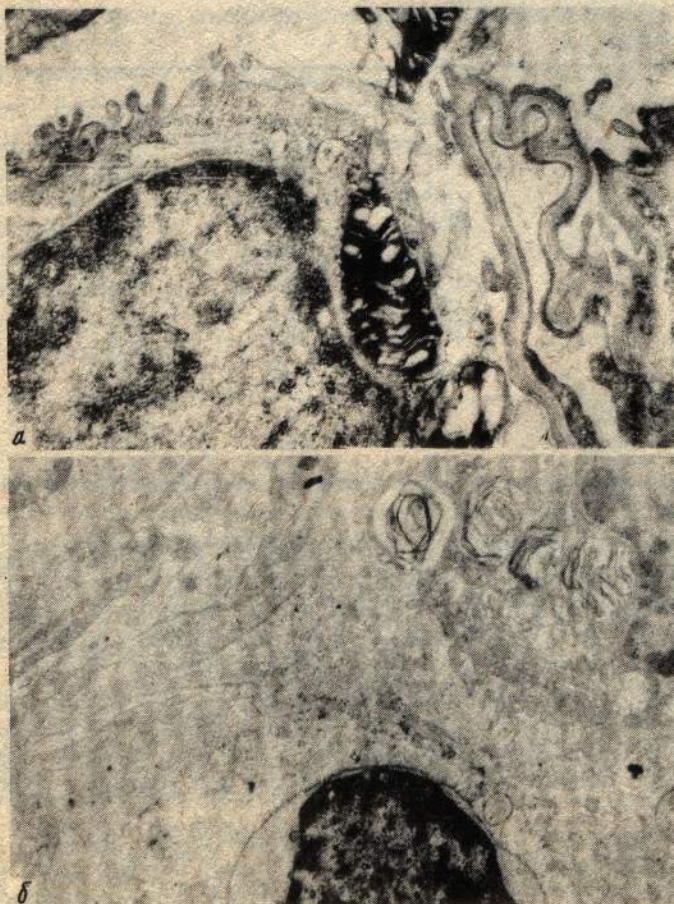
© В. Я. БЕРЕЗОВСЬКИЙ, О. О. БОГОМОЛЕЦЬ, В. Ю. ГОРЧАКОВ,
М. В. ПАЛАГІНА, І. А. ХАСАБОВА, М. А. ХАСІНА, 1992

однорідної кашки, заливали 0,9 %-вим розчином NaCl і струмували протягом 10 хв. Об'єднані фільтрати центрифугували 10 хв при 1 500 g. Густину надосадової рідини доводили до 1,2 г/мл і центрифугували 60 хв при 9 000 g. Фракції фосфоліпідів визначали методом тонкошарової хроматографії [10, 11].

Результати та їх обговорення

Після «підняття» тварин в барокамері на 9 000 м на 2 год відмічено зниження поверхневої активності сурфактантів. Індекс активності зменшився від $0,710 \pm 0,023$ до $0,633 \pm 0,039$ ($P < 0,05$). Аналогічні зміни були одержані раніше [3]. Зниження поверхневої активності сурфактантів легень пов'язане з двукратним зменшенням загальної маси фосфоліпідів на альвеолярній поверхні (від $5,59 \pm 0,01$ до $2,63 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \pm 0,02 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$). При цьому на 10 % знижувався і відносний вміст фосфатидилхоліну в ліпідній фракції сурфактантів (від $70,0 \pm 4,9$ до $62,0 \% \pm 3,2 \%$). Відомо, що порушення синтезу сурфактантів легень пов'язані або зі зменшенням доставки субстратів, або з розвитком тканинної гіпоксії, що призводить до зсуву рН і зменшення швидкості ферментативних реакцій [8].

Проведені нами морфологічні дослідження показали, що перебування тварин в барокамері викликає повнокрів'я капілярів, зменшення просвіту венул і дрібних гілок легеневої артерії. Результати електронно-мікроскопічних досліджень дозволили встановити, що в альвеолярному епітелії та просвітах альвеол зростає число ліпідних гранул різної електронної густини. У просвіті альвеол з'являються нерозкриті ламелярні тільки спіральної структури. В ядрах великих альвеолярних клітин переважає чорний неактивний гетерохроматин (мал. 1, а). В епітелії просте-



Мал. 1. Електроннограми альвеолярних клітин після експонування тварин в барокамері:
а — мієлінові спіралі у просвітку альвеол, в ядрах великих альвеолярних клітин гетерохроматин; б — локальні розширення зовнішньої мембрани оболонки ядра, трансформація внутрішньої мембрани у спеціалізовані структури.

жуються ділянки з надмірним везикулоутворенням. Все це свідчить про виникнення дистрофічного процесу.

В ендотеліальних клітинах під впливом гіпоксії відмічено ущільнення матриксу крист мітохондрій. Частина мітохондрій різко гіпертрофована. Поряд з гіпертрофованими зустрічаються дрібні темні мітохондрії. Ядра клітин набухлі, в деяких випадках виступають у просвіт капілярів. Іноді відмічаються локальні розширення зовнішньої мембрани ядерної оболонки і трансформація внутрішньої мембрани в спеціальні структури у вигляді вип'ячувань (мал. 1, б). Міжальвеолярні перетинки набрякли. В просвітах альвеол з'являються макрофаги, ліпофаги і еритроцити.

Одноразове введення тваринам обзидану знижувало індекс стабільності сурфактантів від $0,710 \pm 0,029$ до $0,641 \pm 0,070$. Мінімальний і максимальний поверхневий натяг при цьому підвищувався на 34—20 % відповідно (табл. 1). Біохімічний аналіз показав, що відносний вміст фосфоліпідів у складі сурфактантів знизився від $54,7 \pm 0,8$ до $26,3 \pm 0,6$ %. Зменшився також відносний вміст тригліцеридів і підвищився вміст вільних жирних кислот (табл. 2). Аналіз фракції фосфоліпідів показав, що відносна кількість фосфатидилхоліну і фосфатидної кислоти зменшилася, а відносний вміст фосфоліпідів в інших фракціях підвищився. Введення обзидану призводило до появи фракцій лізофосфатидилхоліну і лізофосфатидилетаноламіну. Ці зміни дають підставу вважати, що блокада β -адренорецепторів пригнічує у першу чергу синтез фосфатидилхоліну, суттєво не торкаючи синтезу інших ліпідів. Збільшення вмісту жирних кислот і поява лізоформ фосфоліпідів дає підставу вважати, що в цей період в легенях відбувається більш активне руйнування фосфатидилхоліну і фосфатидилетаноламіну.

Таблиця 1. Зміни показників поверхневої активності сурфактантів легень під впливом екзогенних факторів

Варіант досліджу	Поверхневий натяг, мН/м			Індекс стабільності
	статистичний	максимальний	мінімальний	
I. Інтактні тварини	35,7	43,8	20,8	0,710
	2,3	0,9	2,5	0,029
II. Гостра гіпоксична гіпоксія («підняття» в барокамері на висоту 9000 м на 2 год)	39,3	40,1	20,4	0,663
	1,5	0,8	2,3	0,039
III. Введення обзидану (1 мг/100 г)	41,1	52,6	27,1	0,641
	2,2	1,8	1,6	0,018
IV. Введення обзидану після «спуску» з висоти 9000 м	44,7	50,1	24,3	0,694
	1,0	0,8	0,5	0,018
V. Введення обзидану після «спуску» з висоти 9000 м, а тоді ультразвукова інгаляція 10 %-ним розчином поверхнево-активної речовини	43,6	50,2	22,2	0,769
	0,9	0,5	0,5	0,008

Морфологічний аналіз легень показав, що одноразове введення обзидану призводить до збільшення проникності судинної стінки з явищами периваскулярного набряку і помірної клітинної інфільтрації. Серед клітин визначені: лімфоподібні, гістіоцити, тучні клітини. В інтерстиційному просторі багато перехідних форм клітин, в ендоплазматичному ретикулумі яких містяться гранули ліпідів. У великих альвеолярних клітинах мітохондрії набрякли, матрикс розпушений, ламелярні тільця щільно упаковані. У просвіті альвеол — частково нерозкриті ламелярні тільця, які мають вигляд фрагментів мембран. Там же визначаються макрофаги з великою кількістю лізосомальних включень і фагосом, які містять осміофільний матеріал.

Після спільної дії гіпоксії і блокади β -адренорецепторів у просвіті альвеол з'явилися нерозкриті ламелярні тільця, котрі при виділенні сурфактантів методом центрифугування могли осаджуватися як органели клітин. Зміни структури ламелярних тілець при гострій гіпоксії і блокаді β -адренорецепторів призводило до виникнення дефектних тілець, які погано розкривалися після виходу у простір

альвеол, що збільшувало моношар у розділі фаз в легенях. Спільна дія обзидану і гіпоксії знижувала поверхневу активність сурфактантів, але меншою мірою, ніж при застосуванні кожного фактора окремо. Індекс стабільності зменшувався від $0,701 \pm 0,029$ до $0,694 \pm 0,018$. При цьому достовірно вищим виявилось значення мінімального і максимального поверхневого натягу (див. табл. 1). Аналіз біохімічного складу сурфактантів показав, що після об'єднаного впливу гострої гіпоксичної гіпоксії і блокади β -адренорецепторів відносний вміст фосфоліпідів у спільній фракції ліпідів знизився від $54,7 \pm 0,8$ до $34,9 \% \pm 0,1 \%$. У фракції фосфоліпідів були відмічені значне зниження вмісту фосфатидилхоліну (див. табл. 2) і різке збільшення вмісту сфінгомеліну, фосфатидної кислоти і лізоформ.

Т а б л и ц я 2. Відносний ліпідний склад (% контрольного) сурфактантів легень щурів під впливом різних факторів

Речовина, яка входить до складу ендогенного сурфактанту	Інтактні тварини (I)	Тварини, піддані дії гострої гіпоксичної гіпоксії в барокамері на «висоті» 9000 м (II)	Тварини, що отримували обзидан — 1 мг / 100 г (III)	Тварини, що отримували обзидан після «спуску» з висоти 9000 м (IV)	Тварини, що отримували обзидан після «спуску» та ультразвукову інгаляцію 10 % -ним розчином ПАР (V)
Загальна фракція ліпідів					
Фосфоліпіди	$54,7 \pm 0,8$	$43,8 \pm 0,8$	$26,3 \pm 0,6$	$34,9 \pm 0,1$	$51,5 \pm 0,9$
Тригліцериди	$10,4 \pm 0,1$	$11,7 \pm 0,5$	$8,2 \pm 0,4$	$13,7 \pm 0,9$	$11,0 \pm 0,6$
Вільні жирні кислоти	$4,3 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,7$	$6,4 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
Холестерин	$10,3 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,2$	$22,4 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,2$	$11,5 \pm 0,1$
Ефіри холестерину	$12,2 \pm 0,2$	$21,6 \pm 0,9$	$18,3 \pm 0,9$	$18,9 \pm 0,1$	$19,9 \pm 0,3$
Ефіри жирних кислот	$8,1 \pm 0,3$	$9,0 \pm 0,4$	$9,6 \pm 0,5$	$12,2 \pm 0,1$	$17,8 \pm 0,1$
Фракція фосфоліпідів					
Фосфатиділхолін	$70,0 \pm 4,9$	$62,0 \pm 3,2$	$56,6 \pm 0,6$	$47,8 \pm 0,9$	$72,2 \pm 0,3$
Фосфатидилетаноламін-фосфатиділгліцерин	$16,4 \pm 1,6$	$17,5 \pm 1,0$	$24,9 \pm 0,9$	$15,0 \pm 1,0$	$15,3 \pm 1,2$
Сфінгомелін	$4,6 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,4$	$7,5 \pm 0,4$	$1,0 \pm 1,3$	$6,8 \pm 0,9$
Фосфатиділсерин	$6,5 \pm 0,5$	$10,5 \pm 0,6$	$7,1 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,5$
Фосфатиділінозит	$3,7 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,8$	$6,4 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
Лізофосфатиділхолін	Сліди	Сліди	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
Лізофосфатидилетаноламін	Сліди	Сліди	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	Сліди

Морфологічні дослідження легень показали, що за умов спільної дії гіпоксії і обзидану повітряна наповнюваність легень стає мозаїчною. Зони дистелектазів чергуються із емфізематозними ділянками. В кровоносних капілярах відмічаються локальні стази, що дає підстави говорити про порушення мікроциркуляції. Стан органел ендотеліальних клітин свідчить про розвиток дистрофічного процесу. Базальна мембрана капіляра ущільнена, місцями контури її розмиті. Помірно виражена набряклість великих альвеолярних клітин. У їх цитоплазмі вміщається по 2—3 великих ліпідних включення. На відміну від звичної багатопластинчастої будови ламелярні тільця вміщують по 1—2 пластини, число самих тілець на одну клітину менше. У просвіті альвеол зустрічаються вільнолежачі великі альвеолярні клітини, навантажені ліпідами. В міжальвеолярних перетинках велика кількість ліпідних включень, гранульовані тучні клітини, макрофаги з численними лізосомами в цитоплазмі (мал. 2).

Аналіз змін стану сурфактантів і морфології легень у відповідь на сумісний вплив обзидану та гіпоксії дає підставу вважати, що однією з причин зниження поверхневої активності сурфактантів легень є порушення мікроциркуляції крові. Останнє призводить до погіршування постачання клітинам легень субстратів синтезу сурфактантів і до розвитку кисневого голоду клітин. Для корекції стану



Мал. 2. Електронорама альвеолярних клітин після спільного впливу гіпоксії та обзидану (тучні клітини без дегрануляції).

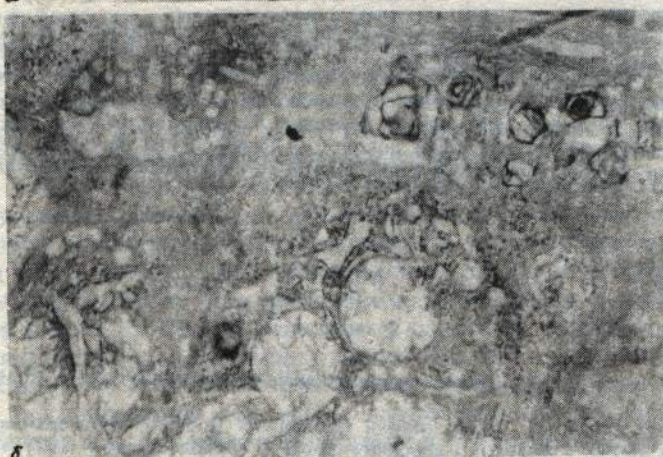
сурфактантів легень після сумісного впливу гострої гіпоксії і блокади β -адренорецепторів проведена інгаляція сурфактантів, виділених із легень свиней. Препарат попередньо очищали від вільного білка. Через 2 год після проведення інгаляції було відмічено збільшення індексу стабільності від $0,694 \pm 0,018$ до $0,76 \pm 0,008$ ($P < 0,05$). Індекс стабільності інтактних тварин складав $0,710 \pm 0,029$. Біохімічний аналіз показав, що тільки вміст фосфоліпідів у складі сурфактантів практично відновлювався, вміст вільних жирних кислот знижувався. Аналіз відносного вмісту фосфоліпідів в окремих фракціях показав, що кількість фосфоліпідів підвищувалася і перевищувала їх вміст в інтактних тваринах. Вміст сфінгомиеліну знижувався до норми. Лізофосфатидилхолін не визначався. Ці результати свідчать про те, що інгаляція екзогенних ПАР покращує біохімічний склад і нормалізує фізико-хімічні властивості вистилаючого комплексу легень.

Морфологічні дослідження показали, що після інгаляції екзогенних сурфактантів на фоні попередньої блокади β -адренорецепторів і гіпоксії змін в мікроциркуляторному руслі не відбувається. Іншою мовою, введення екзогенних сурфактантів не нормалізує мікроциркуляцію, порушену сумісним впливом гіпоксії і обзидану. Одночасно спостерігаються чутливі зміни альвеолярного епітелію. Великі альвеолярні клітини містять значну кількість ламелярних тілець, котрі заповнюють цитоплазму клітин (мал. 3, а). Це підтверджує точку зору, що при перевантаженні альвеолярної поверхні сурфактантами великі альвеолярні клітини захоплюють і використовують їх у наступному синтезі сурфактантів [9]. Цистерни ендоплазматичної сітки великих альвеолярних клітин містять мембраноподібний матеріал, мембрани шорохуватого ретикулума відрізняються великою кількістю рибосом (мал. 3, б). Це можна розглядати як ознаку активації метаболізму клітин, яка призводить до появи основних продуктів сурфактантів.

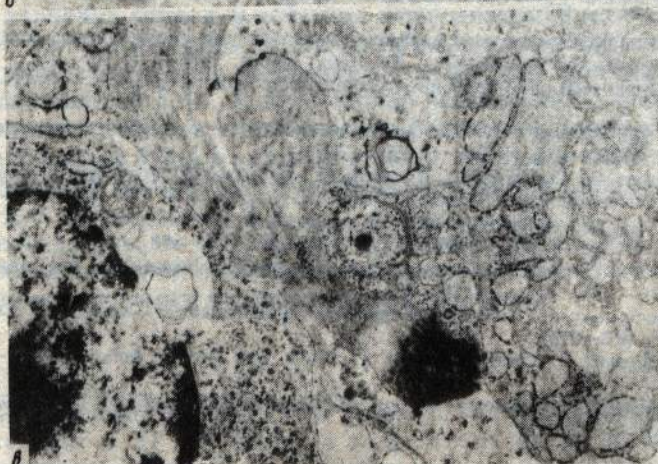
Одержані результати дозволяють зробити висновок, що введення екзогенних ПАР стимулює синтез ендогенних сурфактантів. Підтвердженням активації секреторної діяльності легеневої тканини може бути факт часткової дегрануляції тучних клітин, які звичайно містять велику кількість гранул. Про активацію енергетичного метаболізму свідчать гіпертрофовані мітохондрії. Водночас зростає мозаїчність морфологічних показників стану клітинних елементів. Визначаються ділянки екзоцитозу, де виявляється лізис мембрани великих альвеолярних клітин. Вони містять велику кількість внутрішньоклітинних сурфактантів. У міжальвеолярному просторі між капілярами і великими альвеолярними клітинами багато ліпофіброб-



a



б



в

Мал. 3. Стан альвеолярних клітин після інгаляції екзогенних сурфактантів на фоні попередньої дії гіпоксії та блокади β -адренорецепторів:

a — великі альвеолярні клітини з підвищеною кількістю ламелярних тілець; б — великі альвеолярні клітини з підвищеною кількістю мембран сурфактантів; в — розширення перинуклеарного простору з мієлінізацією внутрішніх та зовнішніх мембран ядра.

ластів, які містять включення ліпідів і мікрофібрили. В деяких ділянках інтерстиція виявляються клітинні скупчення, складені із мікрофагів, плазматичних клітин, лімфоцитоподібних клітин. В останніх спостерігаються розширення перинуклеарного простору з мієлінізацією внутрішньої і зовнішньої мембран, гіпертрофією мітохондрій (мал. 3, в). Оскільки в попередніх серіях експериментів подібних реакцій не спостерігалось, є підстави зв'язувати ці зміни з відповідною реакцією тканини легень на введення екзогенних сурфактантів.

Підсумовуючи одержані результати, потрібно відмітити, що інгаляція щурам екзогенного сурфактанту свині справляє прямий вплив на альвеолярну поверхню легень та надмембранний шар. Надходячи в епітеліальні клітини, екзогенні молекули ПАР стимулюють синтез і секрецію екзогенних сурфактантів. Інгаляційне введення ПАР може бути використане для ургентної ліквідації нестачі ендогенних сурфактантів, збільшення поверхневої активності, відновлювання їх фізіологічних функцій.

V. A. Berezovsky, E. O. Bogomolets, V. U. Gorchakov,
M. V. Palagina, I. A. Khasabova, M. A. Khasina

INFLUENCE OF INHALATION OF SURFACE ACTIVITY MATERIALS ON SURFACTANT SYSTEMS OF THE LUNG

Surface activity, biochemical composition and morphology of the rat lungs were studied in norm, under effect of acute hypoxia and after infusion of obsidan (1mg/100g). The data permit suggesting that under the influence of obsidan and hypoxia a stability index of surfactants and quantity of phospholipids decreased, while the quantity of lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylethanolamine increased. Morphology studies show that after hypoxia and obsidan infusion oedema and cell distruction developed in the lung. The inhalation of exogenous surfactant increased stability index and quantity of phospholipids, decreased the quantity of lysophospholipids but did not eliminate morphological disorders in the lung induced by hypoxia and obsidan infusion.

R. E. Kavetsky Institute of Pathology,
Oncology and Radiobiology, Academy
of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Березовский В. А., Горчаков В. Ю. Поверхностно-активные вещества легкого. — К.: Наук. думка, 1982. — 178 с.
2. Горчаков В. Ю., Коваленко Т. Н. Вплив гострої гіпоксичної гіпоксії на поверхневу активність сурфактантів тканини легень у молодих і дорослих щурів // Фізіол. журн. — 1977. — 23, № 4. — С. 520—523.
3. Горчаков В. Ю. Метод ранней диагностики изменения активности сурфактантов легкого // Новые приборы и методы современной медицины. — К.: Наук. думка, 1980. — С. 84—86.
4. Гронеvский Я. Надмембранный слой клеточной оболочки // Арх. патологии. — 1969. — 31, № 2 — С. 16—25.
5. Слука Б. А. Реакция сурфактантной системы легких на химическую десимпатизацию гуанетидином // Докл. АН БССР. — 1987. — 31, № 3. — С. 281—283.
6. Enhorning G. Chamberlain D., Contreras C., Burgey R., Robertson B. Isoxsurprine induced release of pulmonari surfactant in the rebbit fetys // Amer. J. Obstetr. Gynecol. — 1977. — 129, N 2. — P. 197—202.
7. Faridy E. E. Effect of food and water deprivation on surface activity of lung of rats. // J. Appl. Phisiol. Respir., Environ. and Exercise Phisiol. — 1970. — 39, N 4. — P. 493—498.
8. Morgan T. E. Isolation and Characterisation of lipid N-memethyltransferase from dog lung. // Biochem. et biophys. Acta., 1969. — 178, N 1 — P. 21—32.
9. Rooney S. A. The surfactant system and lung phospholipid biochemistry // Amer. Rev. Respirat. Dis. — 1985. — 131, N 1. — P. 439—460.
10. Tanaka Y., Takai T., Masuda K. Lung surfactant. // Chem. and Pharm. Bull. — 1983. — 31, N 11. — P. 4101—4115.
11. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. A universal reagent for phospholipid analysis. // J. Chromatogr. 1975. — 114, N 1. — P. 129—141.

Ін-т експерим. патології, онкології
та радіобіології ім. Р.Е.Кавецького
АН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 28.12.88