

О.С. Коцарев\*,  
О.С. Мунтян,  
О.О. Хрипкова\*

## МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ СУРФАКТАНТА ЯК ГОЛОВНОЇ АДАПТАЦІЙНОЇ СИСТЕМИ ЛЕГЕНЬ

Дніпропетровська державна медична академія  
кафедра хірургії №1

(зав.- д. мед. н., проф. Я.С. Березницький)

ДЗ «Дорожня клінічна лікарня ст.Дніпропетровськ ДП «Придніпровська залізниця»\*

(гол. лікар – д. мед. н., проф. С.О. Мунтян)

**Ключові слова:** адаптаційна система легень, катаболізм фосфоліпідів, сурфактант, лазолван

**Key word:** pulmonary adaptation system, phospholipides catabolism, surfactant, lasolvan

**Резюме.** Целью исследования было подтверждение возможностей медикаментозной стимуляции системы легочного сурфактанта. В работе представлены результаты сравнительного анализа стимуляции системы легочного сурфактанта у экспериментальных животных с использованием прозерина и лазолвана. Электронномикроскопическая картина свидетельствовала об усилении секреторной активности АП типа, накоплении осмофильного материала (фосфолипидов) в просвете альвеол. Физико-химические особенности нативного сурфактанта не изменялись. Биохимические исследования показали повышение количества лизосоединений, сфингомиелина и фосфолипидов. Сделаны следующие выводы: система сурфактанта обеспечивает активную неспецифическую защиту респираторного отдела легких; важнейший механизм неспецифической защиты лёгких - система катаболизма фосфолипидов сурфактанта, локализованная в терминальных бронхиолах, которая обеспечивает антимикробную активность ферментными системами (набор фосфолипазы, протеаз и лизосоединений); санитизирующее действие обусловлено стимуляцией сурфактанта как важнейшей адаптационной системы лёгких.

**Summary.** The purpose of the investigation was to confirm the possibility of medical stimulation of pulmonary surfactant. In this work we presented the results of comparative analysis of pulmonary surfactant stimulation in experimental animals with the use of proserin and lasolvan. Electronic microscopy testified to elevation of secretory AII type activity, accumulation of osmophilic substances (phospholipides) in the alveolar lumen. Physical and chemical characteristics of native surfactant did not change. Biochemical analyses showed the elevation of lysocompounds, sphingomyelin and phospholipides. The following conclusions were made: surfactant system provides an active nonspecific protection of respiratory portion of the lung; the major nonspecific mechanism of the lung protection is phospholipides catabolism system located in the terminal bronchioles, which provides antimicrobial protection with the help of enzyme systems (phospholipases, proteases and lysocompounds). Sanitation action is determined by surfactant stimulation, being the main adaptational system of lungs.

Легеневий сурфактант - суміш фосфоліпідів, що складається з 2 фаз: нижньої (гіпофаза, рідка), яка складається з глікопротеїдів і згладжує нерівності епітелію, а також поверхневої фази (опофаза) - мономолекулярної фосфоліпідної плівки, звернутої гідрофобними ділянками до просвіту альвеоли [3]. Основні біологічні властивості сурфактанта зводяться до зниження сил поверхневого натягіння в альвеолах (до 10 разів), участі в антимікробному захисті легень та формуванні протинабрякового бар'єру, за рахунок «пропотівання» рідини з легневих капі-

лярів до просвіту альвеоли [14,15]. Пошкодження сурфактанта, без сумніву, є однією з головних складових у патогенезі післяопераційних легневих ускладнень: пневмоній, гострого пошкодження легень (ГПЛ) - acute lung injury (ALI) та його найбільш тяжкої форми - респираторного дистрес-синдрому дорослих (РДСД) - acute respiratory distress syndrome (ARDS) [12,14]. Дослідження останнього часу свідчать про ефективне застосування лазолвану (амброксолу) як стимулятора системи відновлення сурфактанта [4], але механізми сануючої дії

його до кінця не розкриті. Метою дослідження є підтвердження медикаментозної стимуляції сурфактанта як головної адаптаційної системи легень та його сануючої дії.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом дослідження були легені експериментальних тварин, у яких стимулювання системи сурфактанта проводили шляхом порівняння внутрішньочеревного введення 0,05% розчину прозерину та лазолвану в дозі 50 мг/кг маси тіла. Експериментальними тваринами були білі щури з масою тіла 180-200г, що утримувалися на стандартному раціоні в умовах віварію. Використано 51 тварину (41 - для прозеринової моделі, 10 – для лазолванової). Контрольна група

склалася з 20 тварин. Утримання тварин, експеримент та вихід з експерименту шляхом еутаназії проводили згідно з вимогами правил біоетики FELASA [10]. У групі з прозериновою моделлю були використані методи рутинної гістології, електронної мікроскопії. Фізико-хімічні зміни нативного сурфактанта і його фосфоліпідів досліджували за допомогою установки типу ван Вільгельмі із записом ізотерм стиснення і розтягнення, біохімічні дослідження фосфоліпідів сурфактанта проводили методом тонкошарової хроматографії [1, 5]. Активність катаболізму сурфактанта легень оцінювали за показником фосфоліпазної активності (ПФА), який розраховували за такою формулою [ 2 ] :

$$\text{ПФА} = \frac{\% \text{ лізофосфатидилхолін}}{\% \text{ фосфатидилхолін}} \times 100$$

У групі з лазолвановою моделлю були використані методи звичайної гістології, приготування епонових блоків і дослідження напівтонких зрізів, метод непрямой імуногістохімії з використанням авідин-біотинової системи і пероксидази хрому як ферментної мітки для виявлення фосфоліпази А2 поліклональними антитілами (сPLA2 c-20 cs 724, Santa Cruz Biotechnology) в розведенні 1:250 [1,5].

Статистичну обробку та достовірність отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Отримані результати аналізували та порівнювали з морфологічними змінами в респіраторному відділі легень.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При стимуляції системи сурфактанта прозерином макроскопічно легені були підвищеної повітряності, блідо-рожевого та білого кольору, при розтині плевральних порожнин не спадалися. При гістологічному дослідженні судини легень повнокровні, стінки альвеол нерівномірної товщини. Альвеоли та респіраторні бронхіоли розширені. У просвіті альвеол десквамовані альвеолоцити II типу та макрофаги в невеликій кількості (рис. 1). Слизова оболонка термінальних бронхіол набрякла, з добре контурюючими клітинами Клара. При електронній мікроскопії аерогематичного бар'єру найбільші зміни виявлені в альвеолоцитах I та II типу (AI та AII) (рис. 2). Поверхня AI типу гладка, з окремими цитоплазматичними складками. В AI типу,

які мали полігональну форму, виявляється зона цитоплазми, де розташоване ядро діаметром 4,6 мкм, від якої відходять довгі тонкі відростки довжиною 10,25 мкм, товщиною 02-07 мкм. У перинуклеарній зоні невелика кількість мітохондрій, цистерн гладкої та гранулярної ендоплазматичної сітки, невелика кількість рибосом та полісом.

Значна кількість мікрофіламентів, що розташовані по всій цитоплазмі. В цитоплазмі виявлялась велика кількість мікропіноцитозних пухирців та везикул, що говорить про активацію клітин, зокрема, про зростання функціонального стану системи везикулярного транспорту, який, на нашу думку, забезпечує активний транспорт кисню [6, 8]. Сумарна поверхня мембран везикул у декілька разів перевищувала поверхню мембран AI типу. AII типу здебільшого мали кубічну форму, розташовувались на базальній мембрані (рис.3). Ядро овальне, розташоване переважно в центрі клітини.

Гладка ендоплазматична сітка добре розвинута та представлена овальними округлими та витягнутими цистернами, розташованими по всій цитоплазмі. Гранулярна сітка розвинута помірно. В цитоплазмі, переважно в апікальних відділах, знаходилась велика кількість пластинчастих осміофільних тілець, частка котрих була в стані секретії по мерокриновому типу. Осміофільні пластинчасті тілця – це маркери AII типу, вони представлені щільно упакованими фосфоліпідами з домішкою білків. З цих фосфоліпідів

після їх секретії у гіпофазу формується сурфактант - моношарова мембрана на межі гіпофаза – повітря. На поверхні АІІ типу виявлялись численні мікрівійки (рис. 3). У цілому електронномікроскопічна картина свідчила про

посилення секреторної активності АІІ типу, накопичення осміофільного матеріалу (фосфоліпідів) у просвіті альвеол, що відповідало результатам інших дослідників (рис.3 в, г).

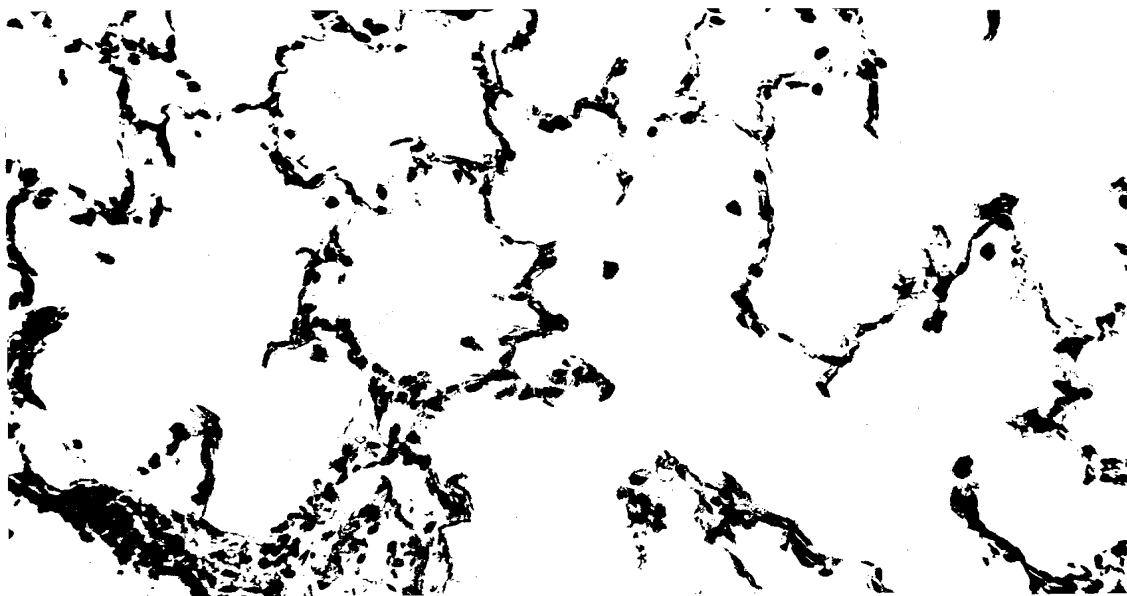


Рис.1. Паренхіма легенів при стимуляції системи сурфактанта прозерином. Забарвлення гематоксиліном-еозином x 400

Фізико-хімічні властивості нативного сурфактанта (отриманого змивом чи екстракцією

фізіологічного розчину) практично не змінювались (табл.1).

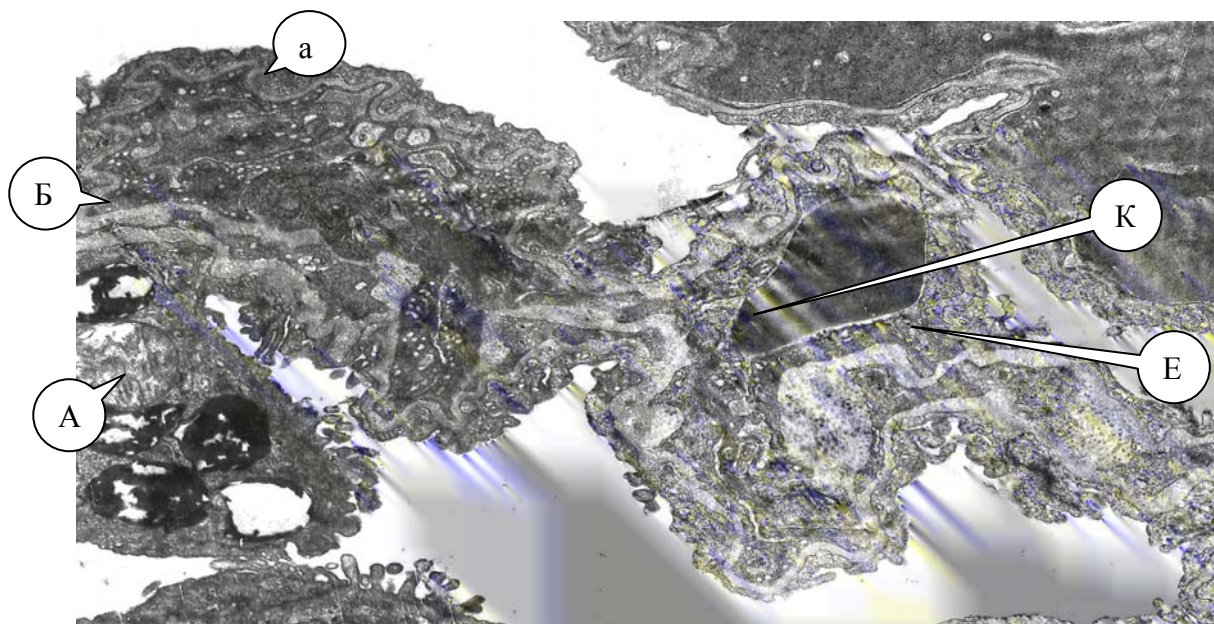
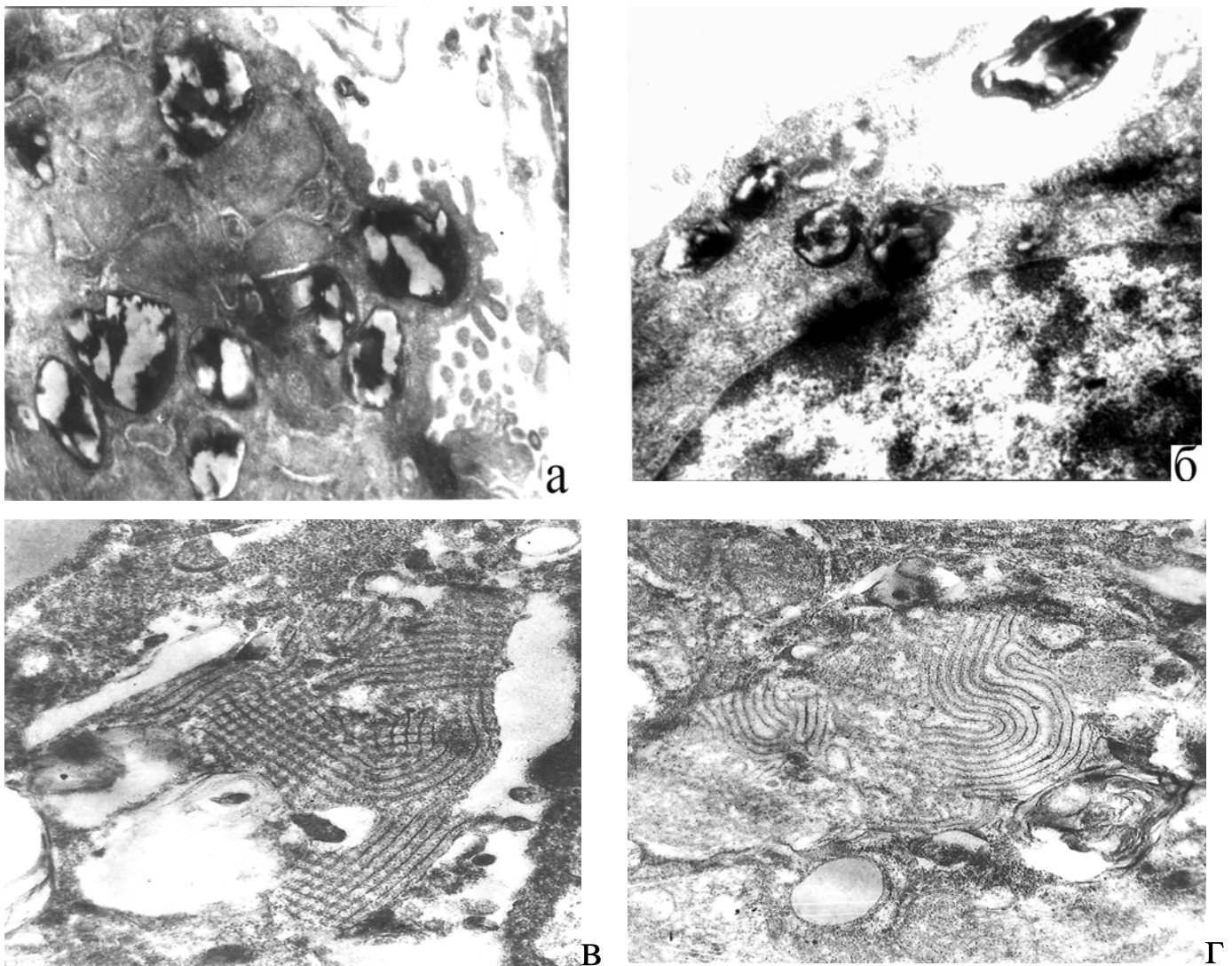


Рис.2. Аерогематичний бар'єр при стимуляції системи сурфактанта прозерином x 5000; а-альвеолоцит I типу, А - альвеолоцит II типу, К-капіляр, Е-ендотеліоцит, Б-базальна мембрана



**Рис. 3. Прозеринова стимуляція системи сурфактанта легенів: а - апікальне розташування осміофільних пластинчастих тілень у цитоплазмі альвеолоциту II-го типу з вибуханням поверхневої цитоплазматичної мембрани, x8000; б – секретія осміофільного пластинчастого тіляця в просвіті альвеоли, x 10000; в, г- накопичення фосфоліпідів у просвіті альвеол x 50 000**

Біохімічні дослідження, проведені методом тонкошарової хроматографії, показали, що при введенні прозерину в складі сурфактанта легень підвищувалась кількість лізосполук до  $3,67 \pm 0,64$  мг/кг (норма  $0,76 \pm 20$ ), кількість сфінгомієліну до  $22,14 \pm 2,04$  мг/кг (норма  $11,33 \pm 1,26$ ), знижувалась кількість фосфатиділхоліну (недостовірно) та фосфатиділетаноламіну. Значно підвищувалися показники фосфоліпазної активності, при цьому кількість фосфоліпідів у тканині легень зростала (табл.2).

Звісно, що лазолван (амброксол) викликає активацію системи сурфактанта, але ж морфологічні зміни у легенях при введенні лазолвану в літературі висвітлені мало.

*Таблиця 1*

**Фізико-хімічні дослідження нативного сурфактанта легень при прозеринівій стимуляції ( $M \pm m$ ),  $p > 0,05$**

Показники	Контрольна група n = 20	Експериментальна група n = 41
Початковий поверхневий натяг, мН/м	$43,92 \pm 0,80$	$51,81 \pm 2,66$
Мінімальний поверхневий натяг, мН/м	$11,11 \pm 0,54$	$13,42 \pm 3,08$
Індекс стабільності за Клементсом	$1,19 \pm 0,04$	$1,23 \pm 0,15$



Таблиця 2

**Біохімічний склад фосфоліпідів  
сурфактанта легень при прозериновій  
стимуляції (M±m)**

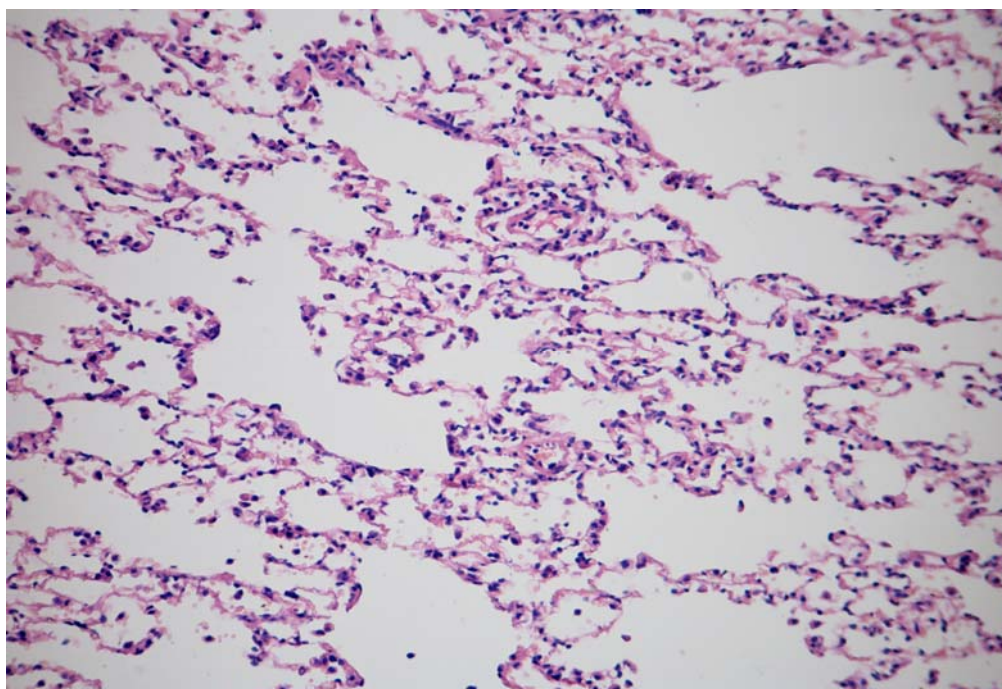
Фосфоліпід, %	Контрольна група n = 20	Експериментальна група n = 41
Лізофосфатидилхолін	0,76 ± 0,20	3,67 ± 0,64*
Сфінгомієлін	11,33 ± 1,26	22,14 ± 2,04*
Фосфатидилхолін	51,05 ± 1,34	48,62 ± 0,94
Фосфатидилетаноламін	37,05 ± 1,87	26,19 ± 2,04
ПФА	0,8 ± 0,09	5,72 ± 0,66*

Примітка: \* -  $p < 0,05$

При стимуляції системи сурфактанта шляхом внутрішньоочеревинного введення шурам лазолвану з розрахунку 10 мг/кг легені макроскопічно були блідо-рожевого кольору, підвищеної повітряності, при розтині плевральних порожнин не збігались.

При забарвленні гематоксиліном – еозином виявлялась помірно виражена, переважно центроацерна емфізема. Судини легень помірно повнокровні, у просвіті альвеол підвищена кількість макрофагів (рис.4).

У слизовій оболонці бронхів відмічено посилення секреторної активності келихоподібних клітин, що особливо помітно при забарвленні на слиз альціановим синім (рис.5). На напівтонких зрізах, забарвлених толуїдиновим синім, альвеолоцитах II типу виявлялась велика кількість постсекреторних вакуолей, розташованих в апікальних відділах клітин (рис. 6).

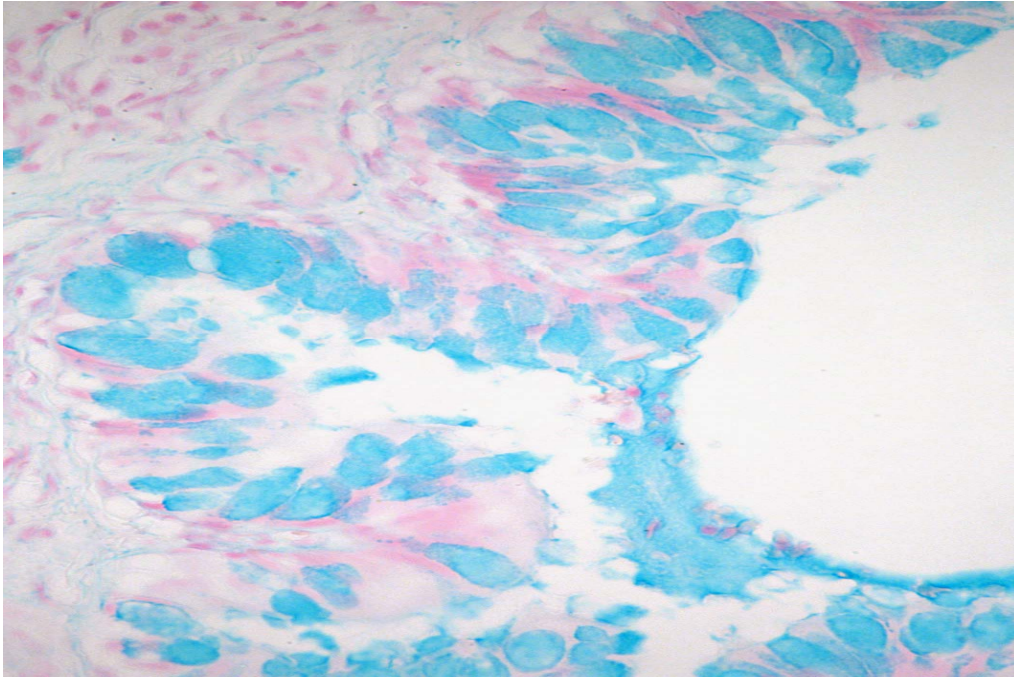


**Рис.4. Паренхіма легень при стимуляції лазолваном. Забарвлення гематоксиліном та еозином, x200**

Накопичення секреторних гранул в апікальних відділах виявлялось також у клітинах термінальних бронхіол. Така підвищена активність мала місце в клітинах Клара та в інших секреторних клітинах. Мали місце ознаки базальної секреції. Макрофаги легень були з підвищеним вмістом фагосом у цитоплазмі, також збільшувалась кількість секреторних гранул. У

товстих клітинах зменшувалась кількість секреторних гранул, що зумовлено, вірогідно, посиленням секреції.

При імуногістохімічному дослідженні на поверхні слизової оболонки виявлена підвищена кількість фосфоліпази A2, що свідчить про активацію системи катаболізму (рис. 7).

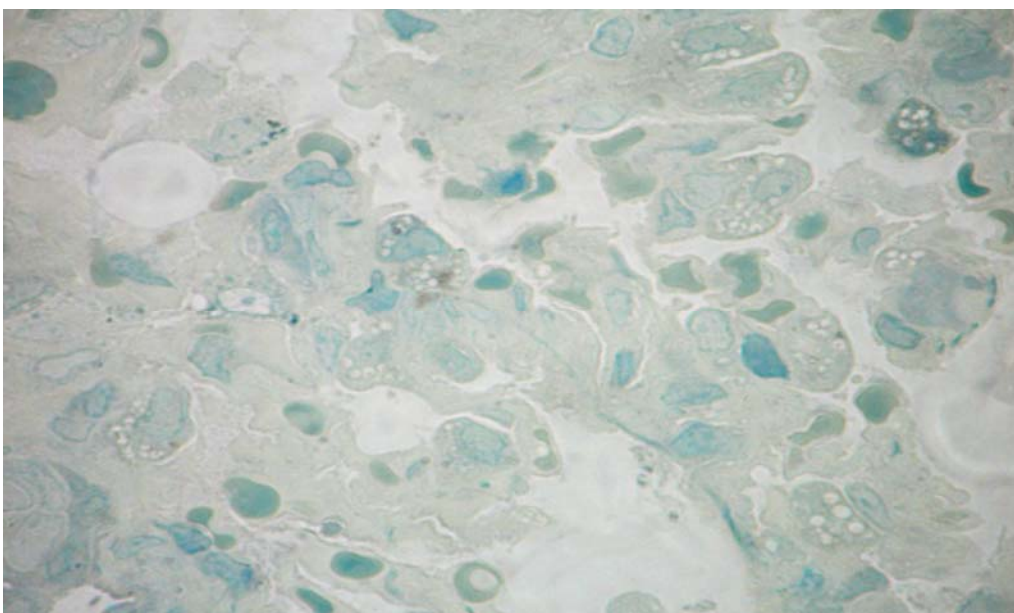


**Рис. 5. Стимуляція системи сурфактанта лазолваном. Секреція слизу келихоподібними клітинами. Забарвлення альцеановим синім x 400**

Отримані нами експериментальні дані щодо введення лазолвану підтверджують активацію системи сурфактанта, як у частці підвищеної секреції сурфактанта, так і у прискоренні його катаболізму.

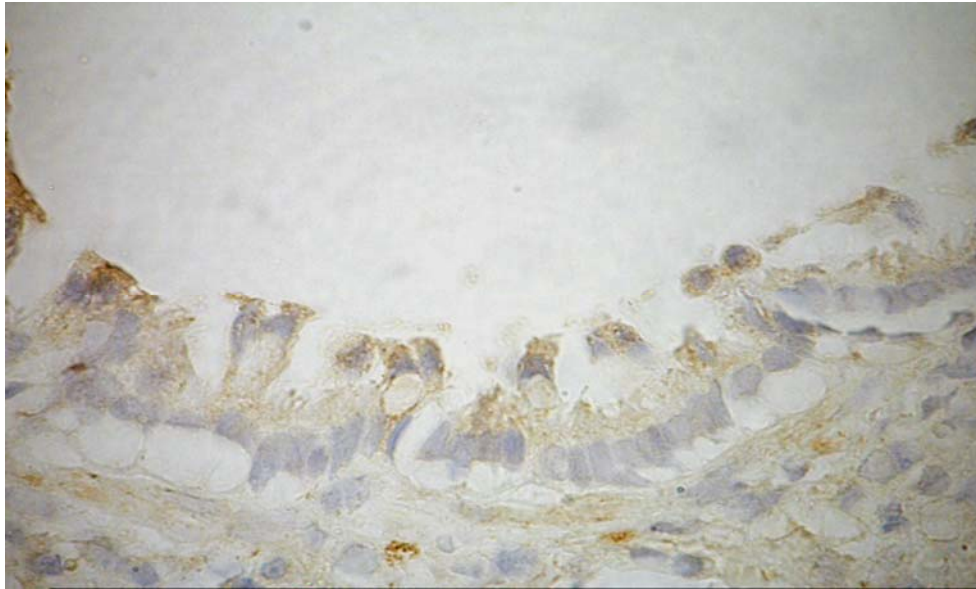
Численні методи профілактики післяопераційних пневмоній, що висвітлювались у науковій літературі, прямо чи побічно приводять до активації системи сурфактанта, і, вірогідніше всьо-

го, ефект цих методів зумовлений здатністю системи сурфактанта забезпечувати неспецифічний захист легень. Механізми неспецифічного легеневого захисту різноманітні та мають багаторівневий характер. По-перше, це активація системи макрофагів. У літературі є багаточисленні повідомлення про здатність фосфоліпідів сурфактанта стимулювати фагоцитарну активність макрофагів безпосередньо [ 7, 9, 11].



**Рис. 6. Стимуляція системи сурфактанта лазолваном. Велика кількість постсекреторних вакуолей в апікальній частині альвеолоцитів II типу. Напівтонкий зріз, x1000**





**Рис. 7. Стимуляція системи сурфактанта лазолваном. Фосфоліпаза А<sub>2</sub> на поверхні слизової оболонки дрібного бронха та в цитоплазмі клітин. Імуногістохімічне дослідження, х 1000**

В останні роки велике значення надається протеїнам сурфактанта: (SP) – SP-A, SP-B, SP-C, SP-D, SP-B, SP-C, які відіграють велику роль у формуванні поверхнево активного шару на межі гіпофаза-повітря та забезпечують рециркуляцію фосфоліпідів сурфактанта. Найбільше значення в системі неспецифічного легеневого захисту мають SP-A. Діючи на макрофаги, SP-A стимулює їх оксидантну активність, посилює лімфоцитарну інфільтрацію, підвищує продукцію прозапальних цитокінів, зокрема TNF $\alpha$  (фактор некрозу пухлин) ІІ (інтерлікінів) альвеолярними макрофагами та моноцитами периферійної крові [6, 8, 9, 12]. SP-A посилює комплімент та імуноглобулін рецептор-залежний фагоцитоз макрофагами, а також через макрофагальний рецептор манози. Однією з функцій SP-A є супресія запальної відповіді і запобігання хронічному запаленню та полегшення фагоцитозу макрофагами [6, 8, 11, 14]. Ефективність взаємодії SP-A та мікроорганізмів залежить від олігомерного складу SP-A протеїну, котрий може коливатися при різних патогенних станах. Наявність SP-A зафіксовано не тільки в респіраторному, але і в кондуктивному відділі легень. Експериментальне підтвердження ролі сурфактанта в антимікробному захисті легень було отримано в дослідженнях на трансгенних тваринах, які не мали в складі сурфактанта SP-A, SP-D. У проведених дослідженнях ці тварини проявляли більш високу (достовірну) чутливість до бактеріальної та вірусної легеневої інфекції порівняно зі звичайними тваринами [8, 9, 13, 15].

Відомо, що альвеоли в нормі стерильні. Це

говорить про те, що основні механізми неспецифічного легеневого захисту знаходяться в трахеобронхіальному дереві. Антимікробна дія може здійснюватися потужними ферментними системами, присутність яких підтверджена багатьма дослідженнями. Перш за все, це фосфоліпази, секретовані в просвіт термінальних бронхіол, в яких саме зосереджені механізми системи катаболізму фосфоліпідів сурфактанта. У процесі гідролізу фосфоліпідів сурфактанта вивільняється арахідонова кислота, яка стає джерелом створення простагландинів та лейкотрієнів - потужних регуляторів імунної відповіді. Крім того, з'являються лізосполуки - «мембранна отрута», яка пошкоджує мембранні структури мікробів. Джерелом протеаз на поверхні термінальних бронхіол є товсті клітини, що секретують катепсину. Слід вважати, що всі компоненти системи катаболізму активуються одночасно. Підвищення кількості фосфоліпаз, що встановлено нами в процесі дослідження, веде до збільшення інших позаклітинних структур системи катаболізму. На підставі проведених досліджень та даних літератури можна стверджувати, що в термінальних бронхіолах формується своєрідна суміш фосфоліпаз, протеаз та лізосполук, які забезпечують надійний антимікробний захист респіраторного відділу легень [3,13].

#### **ВИСНОВКИ**

1. Система сурфактанта забезпечує активний неспецифічний захист респіраторного відділу легень.

2. Найважливішим механізмом неспецифічного захисту легень є система катаболізму фосфоліпідів сурфактанта, локалізована у термінальних бронхіолах, яка забезпечує антимікробну активність ферментними системами

(набір фосфоліпази, протеаз та лізосполук).

3. Сануюча дія зумовлена стимуляцією сурфактанта, що є найважливішою адаптаційною системою легенів.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Загорулько А.К. Атлас ультраструктурной морфологии бронхов в норме и патологии / А.К. Загорулько. - Симферополь.: ИАОКГМУ, 2003.-104с.
2. Лихолат О.А. Способ оцінки системи катаболізму сурфактанту легень / О.А. Лихолат, С.В. Антонюк, О.С. Коцарев // Промислова власність.- 2006.- № 1. - С.1- 6.
3. Нестеров Е.Н. Сурфактантная система легких и коррекция ее нарушений при бронхиальных заболеваниях / Е.Н. Нестеров, Г.Н. Паневская // Пульмонология. – 2000. – №4.- С. 19-25.
4. Овчаренко С.И. Муколитические (мукорегуляторные) препараты в лечении хронических болезней лёгких / С.И. Овчаренко // РМЖ.- 2002.- Т. 10, №4.- С. 12-16.
5. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С.В. Петрова и Н.Т. Райхлина. – Казань: 2004. – 456 с.
6. Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung / A.M. Le Vine, J.A. Whitsett, J.A. Gwozdz [et al.] // J. Immunol. – 2000.- Vol.165.- P. 934-940.
7. Evaluation of alveolar surfactant aggregates in vitro and in vivo / Brackenbury A.M., Malloy J.L., McCaig L.A. [et al.] // Eur. Respir. J.- 2002.- Vol.19, N 1. - P. 41- 46.
8. Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of SP-B Thr1S11le with ARDS / Z. Lin, C. Pearson, V. Chinchilli [et al.] // Clin. Genet. – 2000.- Vol. 58, N 3.- P. 181-191.
9. Prognostic value of surfactant proteins A and D in patients with acute lung injury / I.W. Cheng, L.B. Ware, K.E. Greene [et al.] // Crit. Care Med. – 2003.- Vol.31, N 1.- P. 20 - 27.
10. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1/ Laboratory Animals.- 1996.- Vol.30,N 4.- 298 – 316.
11. Surfactant replacement for ventilator-associated pneumonia: a preliminary report / R.P.Baughman, R.F. Henderson, J.Whitsett [et al.] // J. Respiration.- 2002.- Vol. 69, N 1.- P. 57-62.
12. Surfactant protein-A levels in patients with acute respiratory distress syndrome / T.Balamugesh, S. Kaur, S. Majumdar [et al.] // Indian J. Med. Res.- 2003.- Vol. 17. - P.129-133.
13. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability / H. Wu, A. Kuzmenko, S. Wan et al. // J. Clin. Invest. -2003.- Vol. 111, N 10.- P. 1589-1602.
14. Weaver T.E. Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant / T.E. Weaver, S.L. Na, M. Stahlman // Semin. Cell. Dev. Biol. -2002.- Vol. 13, N4.- P. 263-270.
15. Wright J.R. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense / J.R. Wright // J. Clin. Invest.- 2003.- Vol. 111, N 10.- P.1453-1455.

