

А.Д.Таганович

ИССЛЕДОВАНИЕ СУРФАКТАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЛЕГКИХ С ПОМОЩЬЮ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Кафедра биохимии Минского государственного медицинского института

THE BIOCHEMICAL METHODS OF INVESTIGATION OF LUNG SURFACTANT SYSTEM

A.D.Taganovich

Summary

Complex of modern biochemical approaches in study of lung surfactant content, composition and cell metabolism is analysed in the article. On the basis of received experimental results the advisability of investigation of the condensate of respiratory air as a substance, contained lung surfactant, is called in question.

Резюме

Анализируются биохимические методические подходы к изучению состава сурфактанта легких, содержание липидного, белкового его компонентов и показателей метаболизма сурфактанта в клетках — альвеолоцитах 2 типа и альвеолярных макрофагах. На основании результатов собственных исследований подвергается сомнению целесообразность исследования конденсата выдыхаемого воздуха в качестве материала, содержащего нативный сурфактант легких.

Сурфактантная система легких включает в себя внеклеточный материал, выстилающий поверхность альвеол — сурфактант, и клетки, принимающие участие в его метаболизме. Синтез сурфактанта происходит внутри эпителиальных клеток, выстилающих альвеолы и альвеолярные ходы, — пневмоцитов II типа (П-2). Механизм синтеза включает образование пластинок из содержимого матрикса за счет абсорбции предварительно сформированных в эндоплазматическом ретикулуме липидных мицелл. Местом хранения сурфактанта в П-2, одновременно из которого осуществляется его секреция, являются пластинчатые тельца. У человека и других млекопитающих сурфактант секретируется путем экзоцитоза. В этом процессе принимает участие актин микрофиламентов и микротубулы [51].

К настоящему времени ведущим механизмом обновления сурфактанта в альвеолах легких считается захват его с поверхности альвеол, последующее разрушение и реутилизация П-2 [14]. Вместе с тем в литературе приводятся морфологические и биохимические доказательства важной роли альвеолярных макрофагов в утилизации сурфактанта [5,19,35,50]. Полагают, что в тех ситуациях, когда имеет место избыточное образование сурфактанта или изменение функционального состояния клеток легких, макрофагам может принадлежать значительная доля в катаболизме сурфактанта. Таким образом, к достаточно четко установленным компонентам сурфактантной системы следует причислить сам сурфактант, П-2 и альвеолярные макрофаги.

Соответственно в исследовании сурфактантной системы наибольшее распространение получили две группы биохимических методов: 1) определение химического состава сурфактанта и сурфактантсодержащих структур, материала; 2) оценка показателей синтеза, секреции и катаболизма сурфактанта.

Методы определения состава сурфактанта

Общим методическим подходом выделения сурфактанта из легких для последующего изучения служит получение бронхоальвеолярного смыва (БАС) с последующим фракционированием [11,51]. Гистохимически на поверхности альвеол выявляют гипофазу, которая покрывается поверхностной пленкой, по виду напоминающей искусственные фосфолипидные мембраны. К сожалению, имеющиеся способы выделения сурфактанта из БАС не позволяют получить его в нативной форме. Поэтому анализу поддается состав суммарной сурфактантной фракции.

Сурфактант обычно содержит менее 20% белка. Основным липидным компонентом его является фосфатидилхолин (70—80% от общего количества липидов). Доля нейтральных в общем количестве липидов невысока и колеблется у различных видов млекопитающих от 9 до 22%. Наиболее значительный среди них в количественном отношении холестерин (меньше 10% от массы сурфактанта). Отличительной особенностью является и тот факт, что в составе фосфолипидов сурфактанта сравнительно много фосфати-

диглицерола (3—12%), а среди фосфатидилхолинов преобладает дипальмитоильная молекулярная форма (54—87%) [25,41,46].

Исходя из вышеизложенного, в анализе состава сурфактанта больше других используются методы количественного и качественного определения липидов, особенно фосфолипидов. Сначала проводят экстракцию липидов процедурой, впервые описанной *J. Folch et al.* [21], с различными модификациями [40]. В полученном экстракте определяют содержание общих фосфолипидов. Существуют различные способы оценки, но к наиболее устоявшимся и широко используемым следует причислить минерализацию аликвоты липидного экстракта в серной кислоте [1] или хлорной кислоте [47] с последующим проведением цветной реакции на фосфор [36,47]. Этот же метод является базовым для определения количества отдельных видов фосфолипидов, предварительно разделенных тонкослойной хроматографией (ТСХ).

Следует критически проанализировать методические подходы к анализу фосфолипидов. В некоторых лабораториях распространено использование для разделения липидов и фосфолипидов готовых пластинок, которые покрыты силикагелем, а в качестве скрепляющего агента служит крахмал. Поэтому после разделения фосфолипидов на фракции затруднен их количественный учет. Присутствие крахмала не позволяет произвести процедуру сжигания вследствие неизбежного его обугливания. В классическом варианте на стеклянные пластинки наносят взвесь, состоящую из силикагеля, гипса и воды [7]. Пластины готовят за 24 ч до нанесения липидов и активируют перед нанесением в течение 1 ч при +110°C [12]. Для разделения фосфолипидов на основные типы самым простым методом является одноэтапная одномерная ТСХ в системе растворителей хлороформ—метанол—вода [48]. Зоны на силикагеле, соответствующие той или иной идентифицированной фракции, становятся видимыми после окрашивания в парах йода. Затем их соскребают в стеклянные пробирки из пирексного стекла, добавляют кислоту и помещают в песчаную баню при температуре 180—200°C на период от 40 мин до 2 ч. В минерализованных пробах проводят цветную реакцию на фосфор.

В ряде случаев для количественного или полуколичественного определения фосфолипидов, разделенных на сорбентах с крахмалом, ввиду невозможности процедуры сжигания предпочтение отдают компромиссному приему. Липиды окрашивают прямо на пластинке фосфорномолибденовой кислотой или в парах йода с последующим денситометрированием окрашенных фракций. Для исследования сурфактанта такой способ едва ли может быть применен вследствие индивидуальных особенностей названных красителей. Йод обычно используется только для визуализации пятен на хроматограмме. Количественная оценка окрашенных им липидов невозможна по двум причинам. Он быстро возгорается, а ненасыщенные фосфолипиды окрашиваются им более интенсивно [1]. При опрыскивании хроматограммы фосфорномолибденовой кислотой и после-

дующем нагревании при 100—120°C не проявляются насыщенные жирные кислоты и их глицериновые эфиры, обнаруживается избирательная тропность красителя к веществам стероидной природы. С учетом преобладания полностью насыщенных молекулярных форм среди фосфатидилхолинов сурфактанта информация, полученная с помощью фосфорномолибденовой кислоты, не отражает ни действительного абсолютного содержания, ни процентного распределения фосфолипидов в его составе.

Для количественного учета фосфолипидов, разделенных ТСХ, приемлемы методы, основанные на денситометрическом сканировании окрашенных хроматограмм. Наиболее простым способом является проявление фракции после полного удаления растворителя с пластинки обрызгиванием из пульверизатора 50% раствором серной кислоты [17] и нагревания при 200°C в течение 80 мин. Нами был установлен именно такой минимальный срок нагревания пластинок в вышеуказанных условиях, когда происходило полное сжигание ненасыщенных и насыщенных липидов, которые обнаруживаются в виде черных пятен на белом фоне.

Абсолютное количество вещества в обуглившихся пятнах определяется по интенсивности его оптического поглощения в видимой области на денситометре. Необходимо отметить, что при условии пробега фронта растворителя на пластинке, не превышающего 8 см, сохраняется закон Ламберта—Бэра [6]. Поскольку интенсивность пятна при обугливании и сжигании есть функция нескольких переменных, главным образом молекулярной массы и строения липидов, то необходимо для каждого вида определяемых посредством денситометрирования фосфолипидов построить свои калибровочные прямые. Строгая стандартизация нанесения и хроматографирования фосфолипидов обеспечивает количественное воспроизведение результатов с ошибкой 8—10%.

Достаточно удобным и простым способом быстрой оценки содержания общих фосфолипидов в сурфактанте легких является колориметрическое их определение с использованием ферротриационата аммония [45]. Метод не требует процедуры сжигания и высоко специфичен для определения дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Однако оценить содержание только насыщенных молекулярных форм среди других фосфолипидов сурфактанта этим методом не представляется возможным.

В 1976 г. *R.J. Mason et al.* [31] предложили метод выделения насыщенных форм фосфатидилхолинов из смеси липидов сурфактанта, который до сих пор широко используется исследователями. В основе метода лежит способность тетраокси осмия окислять двойные связи. Метод был предложен для выделения насыщенных фосфатидилхолинов посредством колоночной хроматографии. В дальнейшем он был адаптирован для ТСХ. Проводится двухмерная ТСХ. В первом направлении идет отделение фосфатидилхолинов от других фосфолипидов с использованием системы растворителей хлороформ—метанол—вода (65:25:4). Затем пятно, соответствующее фосфатидил-

холину, обрабатывается раствором тетраоксида осмия в четыреххлористом углероде для окисления ненасыщенных форм и производится хроматография в перпендикулярном первому направлению в системе растворителей, включающей хлороформ — метанол — аммиак (65:35:5). Фосфатидилхолин разделяется на динасыщенную, мононенасыщенную и диненасыщенную молекулярные формы.

Предложен ряд специальных приемов определения другого важнейшего фосфолипида сурфактанта — фосфатидилглицерина [13,39]. Все они основаны на отделении его посредством ТСХ. Следует иметь в виду, что при достаточно мелком размере частиц силикагеля и при корректном приготовлении пластинок фосфатидилглицерин отделяется в обычной системе растворителей (хлороформ—метанол—вода). В этом случае он находится выше фосфатидилхолина, но ниже фосфатидилэтаноламина [13]. В любом случае для идентификации исследуемых фракций на хроматограмме применяют чистые вещества-свидетели, дабы установить подвижность применительно к условиям той лаборатории, где проводится исследование.

Наряду с фосфолипидами в анализе состава сурфактанта важное место занимает белковый компонент. Существенным обстоятельством, ограничивающим использование общепринятых методов определения белка, таких как метод *Lowry* [30], является присутствие в сурфактанте большого количества липидов. Развивающаяся муть мешает количественному учету интенсивности окраски. Последняя, как известно, пропорциональна содержанию белка. В то же время преимущество метода *Lowry* в высокой его чувствительности, что очень существенно для сурфактанта, в котором белка мало. К настоящему времени имеется несколько методов, позволяющих преодолеть это препятствие. Все они основаны на введении в используемые реактивы ионного детергента додецилсульфата натрия (DDS-Na) [18,24]. Наиболее прост метод, предложенный *J.Dulley* [18]. Согласно ему в один из реактивов, используемых в методе *Lowry*, добавляется 0,5% раствор DDS-Na. В результате муть при последующем добавлении реактива Фолина не образуется.

Весьма значителен и не до конца исследован вопрос о составе белкового компонента сурфактанта. Использование гель-хроматографии, изоэлектрофокусирования, электрофореза в полиакриламидном геле, иммуноэлектрофореза позволило прийти к заключению, что основными его представителями являются белки с молекулярной массой 28—36 кД, которые объединены единым термином “апопротеин А” и еще один мултимерный белок с молекулярной массой 39 кД — апопротеин Д [23,26,38,52]. Все они имеют отрицательный заряд в нейтральной среде, богаты глицином и аминокислотами. На аминокислом конце их полипептидных цепей находится изолейцин. Обработка апопротеинов нейраминидазой с последующим изоэлектрофокусированием показала, что белки с молекулярной массой 36 и 32 кД построены на базе белка 28 кД. Модификация его происходит на уровне посттрансляции за счет гликозилирования [27]. Сравни-

тельно малую часть в апопротеиновом компоненте сурфактанта (около 1%) занимают белки с молекулярной массой менее 10 кД [15,53]. Они получили название “апопротеин В” и “апопротеин С”. Обнаруженное качественное и количественное изменение апопротеинов сурфактанта при заболеваниях легких [42] указывает на перспективность использования методов их исследования для выяснения патогенеза ряда легочных расстройств.

Новым направлением изучения сурфактанта является анализ пространственного расположения липидов и белков в его составе. При этом исходят из той посылки, что сурфактант имеет структуру, напоминающую мембранные образования. В любой биологической мембране изменение пространственной ориентации липидно-белковых комплексов, как правило, сказывается на функции мембраны. Поэтому и методы, которыми решается проблема для сурфактанта, схожи с применяемыми для изучения мембран. К ним относятся оценка внутренней триптофановой флуоресценции целого сурфактанта или сурфактантных белков в отдельности [49], зондовая флуоресценция, когда гидрофобный зонд вводится в состав сурфактанта, а измерение параметров его флуоресценции дает информацию о структурном состоянии микроокружения [20]. С этой же целью применяются методы оценки микровязкости липидов и фазовых переходов в сурфактанте легких, о которых судят по поляризации зондовой флуоресценции [10], сканирующей калориметрии [34].

Исследование конденсата выдыхаемого воздуха

Бытует мнение, которое имеет достаточно много сторонников у нас в стране, что информация о сурфактанте легких может быть получена путем исследования конденсата выдыхаемого воздуха [4]. С точки зрения доступности и простоты сбор конденсата является предпочтительным по сравнению с процедурой БАС. Однако до настоящего времени остается проблематичным вопрос о том, в какой мере конденсат выдыхаемого воздуха может дать информацию о сурфактанте и может ли он дать ее вообще.

Учитывая имеющиеся сложности, в настоящей статье мы решили привести результаты сравнительного исследования конденсата выдыхаемого воздуха и сурфактантной фракции БАС, полученные нами у больных с фиброзными изменениями в легких. Все больные на основании классификационных критериев [2] были разделены на три группы в зависимости от степени развития фиброзных изменений.

Чтобы иметь представление о возможных фосфолипидах в составе конденсата выдыхаемого воздуха, а в литературе имеются положительные данные по этому вопросу [3], для анализа использовался заведомо большой объем собранного конденсата (8—10 мл). Но даже в этом объеме нам не удалось обнаружить заметные количества конкретных фосфолипидов. Общий липидный фосфор, хотя и в небольших количествах, но определялся. Наибольшее его содержание отмечено у больных со II стадией выраженности фиброзных

Т а б л и ц а

Содержание общего липидного фосфора в конденсате выдыхаемого воздуха и сурфактантной фракции БАС у больных с пневмофиброзом ($M \pm m$)

Выраженность пневмофиброза	Содержание липидного фосфора			
	Конденсат, мкмоль/л	n	Сурфактант, мкмоль/л БАС	n
I стадия	$3,87 \pm 0,55$	23	$11,94 \pm 1,36$	22
II стадия	$5,04 \pm 0,57$	48	$13,47 \pm 1,15$	28
III стадия	$2,60 \pm 0,32^{*,**}$	28	$12,28 \pm 1,86$	16
Контроль	$3,55 \pm 0,54$	29		

Примечание. В качестве контроля обследовали практически здоровых людей, которые по возрастному-половому составу соответствовали выделенным группам больных с фиброзом. * — $p \leq 0,05$ по сравнению с I стадией; ** — $p < 0,05$ по сравнению со II стадией.

изменений в легких, а наименьшее — с III стадией (таблица). Статистически достоверной разницы по сравнению с контролем не было ни в одной стадии патологического процесса. Различия же определяемых значений этого показателя между стадиями наблюдались значительные.

Результаты изучения фосфолипидов сурфактанта легких, полученного из БАС больных в различных стадиях выраженности пневмофиброза, не выявили существенных изменений уровня фосфолипидов сурфактанта между стадиями заболевания (см. таблицу). По вполне понятным причинам мы не имели возможности сравнить эти показатели с нормой. Таким образом, сходство изменений содержания общего липидного фосфора в конденсате выдыхаемого воздуха и в сурфактантной фракции БАС отсутствует. По-видимому, если конденсат и содержит информацию о сурфактанте, то небольшую, и не о нативном сурфактанте, а, скорее, о продуктах его катаболизма. Нельзя исключить и влияние слюны. В самом деле, выдыхаемый воздух, наряду с предполагаемым вовлечением в свой состав элементов сурфактанта, равновероятно может содержать испаряющиеся из ротовой полости компоненты слюны. Устройство слюноулавливателя, предусмотренное в аппарате для сбора конденсата, эффективно только для жидкости.

Приведенные сомнения в отношении представлений о конденсате выдыхаемого воздуха, как своеобразном "зеркале" сурфактанта или источнике информации о нем, ни в коей мере не умаляют значения этой жидкости как ценного, легкодоступного материала для поиска диагностических и прогностических критериев развития и течения целого ряда заболеваний легких [8,9].

Исследование клеточного компонента сурфактантной системы

Гораздо более сложно методическое обеспечение исследования клеточного компонента сурфактантной системы легких. Здесь определение биохимического

состава используется лишь как вспомогательная процедура. Ведущее место занимают радиоизотопные методы в сочетании с методами культуры клеток. С их помощью оцениваются и анализируются конкретные метаболические превращения сурфактанта. Культивирование изолированных П-2 с радиоактивными предшественниками синтеза фосфолипидов позволило установить, что ДПФХ образуется в этих клетках двумя путями: 1) прямым синтезом из дипальмитоилглицерина и ЦДФ-холина; 2) через ацилирование 1-пальмитоил-2-лизофосфатидилхолина посредством пальмитоил-КоА [32,43]. В этом же плане весьма перспективными являются методы, позволяющие оценить синтез и секрецию сурфактантных липидов П-2. Здесь имеются три возможных варианта и соответственно три методических подхода. В первом оценивается синтез жирных кислот из своих низкомолекулярных предшественников (^{14}C -ацетат) *de novo* в самих клетках [16,28]. Во втором изучают поглощение и утилизацию экзогенной пальмитиновой кислоты для синтеза ДПФХ [34,43]. В третьем клетки культивируют с радиоизотопсодержащим холином, еще одним субстратом синтеза фосфатидилхолина.

Помимо синтеза сурфактанта в П-2 оценивается способность этих клеток разрушать захваченный извне ДПФХ и реутилизировать для синтеза того же сурфактанта [14,28]. Для этого предварительно выделенные клетки культивируют с липосомами, приготовленными из смеси фосфолипидов с холестерином. Возможно использование вместо липосом радиоактивно-меченного нативного сурфактанта легких [29]. С целью получения его животным внутривенно вводят предшественники синтеза фосфолипидов (предпочтительным является ^3H -холин). По прошествии 4 ч выделяют сурфактант, 98% метки в составе которого встроено в фосфатидилхолины.

Схожим образом исследуют катаболические превращения сурфактанта в альвеолярных макрофагах. Показательна работа *N.Stern et al.* [44]. В ходе ее использовался сурфактант, меченный тремя способами: ^{125}I , флуоресцеином и ^3H -пальмитатом. Это дало возможность не только зафиксировать, но и измерить при культивировании его с альвеолярными макрофагами сразу несколько процессов: захват сурфактанта клетками; гидролиз в них фосфолипидов сурфактанта и встраивание высвобождающихся жирных кислот в триацилглицерины; независимый катаболизм фосфолипидов и белков сурфактанта.

Среди множества ферментов, активность которых в альвеолярных макрофагах имеет самое непосредственное отношение к катаболизму сурфактанта, на особом месте стоят фосфолипазы A_1 , A_2 и C . Они катализируют расщепление фосфолипидов. Из существующих способов оценки фосфолипазной активности предпочтение отдается тем, которые более специфичны. И здесь несомненным преимуществом обладают методы, основанные на контроле расщепления синтетических субстратов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина), изотопмеченных в строго определенном положении. Ферментативная активность фик-

сируется по выходу из субстрата радиоактивных продуктов гидролиза, а они обнаруживаются после разделения липидного экстракта на фракции методом ТСХ [22,37].

Возможности методических подходов к биохимическому исследованию сурфактантной системы легких, безусловно, не ограничиваются перечисленными. Есть целое направление, где о синтезе и секреции сурфактанта судят, используя органную культуру целых легких или их срезов. Биохимическими методами изучают функциональную активность сурфактанта, связанную с его влиянием на метаболизм контактирующих с ним клеток. Избрание того или иного методического обеспечения вытекает из конкретных задач работы. Ограниченные возможности вынуждают исследователя максимально упрощать методическое решение эксперимента. Это часто приводит к ложным выводам. В выборе той или иной методики исследования сурфактантной системы, как и любой другой, следует опираться на мировой опыт. Только в случае использования тщательно продуманных и отработанных методов можно избежать несуществующих "открытий", а полученная информация продвинет имеющиеся представления о сурфактантной системе легких в норме и патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кейтс М. Техника липидологии: Выделение, анализ и идентификация липидов: Пер. с англ.— М.: Мир, 1975.
2. Петрунина М.П. Клиническое изучение фиброза легких при туберкулезе // Пробл. туб.— 1973.— № 9.— С.30—34.
3. Процюк Р.Г. // Сурфактантная и антисурфактантная система легких.— Харьков, 1990.— С.66—68.
4. Сидоренко Г.И., Зборовский Э.И., Левина Д.И. Атравматический метод исследования поверхностно-активных свойств легкого (сурфактанта): Метод. рекомендации.— Минск, 1981.
5. Филипенко Л.Н. Участие легочных макрофагов в регуляции количества сурфактанта на поверхности альвеол // Бюл. exper. биол.— 1977.— № 12.— С.646—650.
6. Шеллард Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое: Пер. с англ.— М., Мир, 1971.
7. Шталь Е. Хроматография в тонких слоях: Пер. с нем.— М.: Мир, 1965.
8. Яковлева О.А., Кучук А.П., Баяк Н.Ю., Зубко Е.В. Значение конденсата выдыхаемого воздуха в оценке влаговыведительной функции легких // Врач. дело.— 1987.— № 10.— С.91—92.
9. Яковлева О.А. Диагностические возможности изучения конденсата выдыхаемого воздуха // Тер. арх.— 1990.— № 3.— С.102—107.
10. Barkai G., Mashiach S., Goldman B. et al. The effect of pressure on the lipid microviscosity and phase transition of lung surfactant // Biochim. Biophys. Acta.— 1985.— Vol.834, № 1.— P. 103—109.
11. Bernhard W., von der Hardt H. Bronchial surfactant: phospholipid classes and phosphatidylcholine molecular species as indicators of its alveolar origin // Appl. Cardipulmon. Pathophysiol.— 1995.— Vol.5, Suppl. 3.— P.6—7.
12. Blank M.L., Schmit J.A., Privett O.S. Quantitative analysis of lipids by thin-layer chromatography // J. Amer. Oil. Chem. Soc.— 1964.— Vol.41, № 5.— P.371—376.
13. Cernansky G., Liao D.-F., Hashim S.A., Ryan S.F. Estimation of phosphatidylglycerol in fluids containing pulmonary surfactant // J. Lipid Res.— 1980.— Vol.21, № 8.— P.1128—1131.
14. Chander A., Reichert J., Fisher A.B. Degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine by isolated rat granular pneumocytes and reutilization for surfactant synthesis // J. Clin. Invest.— 1987.— Vol.79, № 4.— P.1133—1138.
15. Claypool W.D., Wang D.L., Chander A., Fisher A.B. "Hydrophobic" surfactant-apoproteins and augmentation of phospholipid recycling // Exp. Lung. Res.— 1984.— Vol.6, № 3—4.— P.215—222.
16. Dobbs L.G., Mason R.J., Williams M.C. et al. Secretion of surfactant by primary cultures of alveolar type II cells isolated from rats // Biochim. Biophys. Acta.— 1982.— Vol.713, № 1.— P.118—127.
17. Downing D.T. Photodensitometry in the thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids // J. Chromatogr.— 1968.— Vol.38, № 4.— P.91—99.
18. Dulley J., Grieve P. A simple technique for elimination interference by detergents in the Lowry method of protein determination // Anal. Biochem.— 1975.— Vol.64, № 1.— P.136—141.
19. Eckert H., Lux M., Lachman B. The role of alveolar macrophages in surfactant turnover // Lung.— 1983.— Vol.161, № 2.— P.213—218.
20. Elledge B.W., Whitsett J.A. Structure of hydrophobic surfactant protein SP-B indicated by use of intrinsic tryptophan fluorescence // Am. Rev. Respir. Dis.— 1988.— Vol.137, № 4.— Suppl.— P.A285.
21. 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.— Vol.226, № 1.— P.497—509.
22. Franson R., Beckerdite S., Wang P. et al. Some properties of phospholipases of alveolar macrophages // Biochim. Biophys. Acta.— 1973.— Vol.296, № 2.— P.365—373.
23. Johansson J., Curstedt T., Robertson B. The proteins of the surfactant system // Eur. Respir. J.— 1994.— Vol.7.— P.372—391.
24. Kaplan R.S., Pedersen P.L. Determination of microgram quantities of protein the presence of milligram levels of lipid with amido black 10B // Anal. Biochem.— 1985.— Vol.150, № 1.— P.97—104.
25. Khan A.Q., Sikpi M.O., Das S.K. Phospholipid composition of guinea pig lung lavage // Lipids.— 1985.— Vol.20, № 1.— P.7—10.
26. King R.J. Composition and metabolism of the apolipoproteins of pulmonary surfactant // Ann. Rev. Physiol.— 1985.— Vol.47.— P.775—788.
27. Kuroki Y., Mason R.J., Voelker D.R. Pulmonary surfactant apoprotein A. Structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells // J. Biol. Chem.— 1988.— Vol.263, № 7.— P.3388—3394.
28. Lesur O., Bouhadiba T., Melloni B. et al. Alteration of surfactant lipid turnover in silicosis: evidence of a role for surfactant-associated protein A // Int. J. Exp. Pathol.— 1995.— Vol.76.— P.287—298.
29. Lewis R.W., Harwood J.L., Richards R.J. A method for preparing radiolabeled rat pulmonary surfactant // Biochem. J.— 1986.— Vol.235, № 1.— P.75—79.
30. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the pholin-phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951.— Vol.193, № 1.— P.265—275.
31. Mason R.J., Nellenbogen J., Clements J.A. Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide // J. Lipid Res.— 1976.— Vol.17, № 3.— P.281—284.
32. Mason R.J., Nellenbogen J. Synthesis of saturated phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol by freshly isolated rat alveolar type II cells // Biochim. Biophys. Acta.— 1984.— Vol.794, № 3.— P.392—402.
33. McMurchie E.J., Teubner J.K., Gibson R.A. Thermal phase transitions in sheep, rat and rabbit surfactant lipids detected by differential scanning calorimetry // Comp. Biochem. Physiol.— 1983.— Vol.74A, № 2.— P.295—299.
34. Miles P.R., Wright J.R., Bowman L., Castranova V. Incorporation of [3H]palmitate into disaturated phosphatidylcholines in alveolar type II cells isolated by centrifugal elutriation // Biochim. Biophys. Acta.— 1983.— Vol.753, № 1.— P.107—118.
35. Miles P.R., Bowman L., Castranova V. Incorporation of [3H]palmitate and [14C]choline into disaturated phosphatidylcholines in rat alveolar macrophages // Ibid.— 1985.— Vol.833, № 2.— P.343—350.
36. Morrison W.R. A fast, simple and reliable method for the microdetermination of phosphor in biological material // Anal. Biochem.— 1964.— Vol.7, № 2.— P.218—224.
37. Moscat J., Herrero C., Garsia-Barreno P., Municio A.M. Phospholipase C-diglyceride lipase is a major pathway for arachidonic acid release in macrophages // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1986.— Vol.141, № 1.— P.367—373.

38. Persson A., Chang D., Crouch E. Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein // *J. Biol. Chem.*— 1990.— Vol. 265, № 10.— P. 5755—5760.
39. Poorthuis B.J., Yazaki P.J., Hoestetter K.Y. An improved two-dimensional thin-layer chromatography system for the separation of phosphatidylglycerol and its derivatives // *J. Lipid Res.*— 1976.— Vol. 17, № 4.— P. 433—437.
40. Ryan S.F., Hashim S.A., Cernansky G. et al. Quantification of surfactant phospholipids in the dog lung // *Ibid.*— 1980.— Vol. 21, № 8.— P. 1004—1014.
41. Shelley S.A., Paciga J.E., Balis J.M. Lung surfactant phospholipids in different animal species // *Lipids.*— 1984.— Vol. 19, № 11.— P. 857—862.
42. Singh G., Katyal S.L. Surfactant apoprotein in nonmalignant pulmonary disorders // *Am. J. Pathol.*— 1980.— Vol. 101, № 1.— P. 51—62.
43. Smith F.B., Kikkawa Y., Diglio C.A., Dalen R.C. The type II epithelial cells of the lung. IV. Incorporation of 3H-choline and 3H-palmitate into lipids of cultured type II cells // *Lab. Invest.*— 1980.— Vol. 42, № 3.— P. 296—301.
44. Stern N., Riklis Sh., Kalina M., Tietz A. The catabolism of lung surfactant by alveolar macrophages // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1986.— Vol. 877, № 3.— P. 323—333.
45. Stewart J.C.M. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate // *Anal. Biochem.*— 1980.— Vol. 104, № 1.— P. 10—14.
46. Tanaka Y., Takei T. Lung surfactants. Comparison of surfactants prepared from lungs of calf, ox, dog and rabbit // *Chem. Pharm. Bull.*— 1983.— Vol. 131, № 11.— P. 4091—4099.
47. Vaskowsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatogr.*— 1975.— Vol. 114, № 1.— P. 129—141.
48. Wagner H., Horhammer L., Wolff P. Dunnschichtchromatographie von phosphatiden und glykolipiden // *Biochem. Zschr.*— 1961.— Bd 334.— S. 175—184.
49. Waring A.I., Taeusch H.W. Molecular domain specific lipid-protein interactions in pulmonary surfactants containing different surfactant proteins // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1988.— Vol. 137, № 4.— Suppl.— P. A279.
50. Wright J.R., Clements J.A. Metabolism and turnover of lung surfactant // *Ibid.*— 1987.— Vol. 135, № 3.— P. 426—444.
51. Wright J.R. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance // *Ann. Rev. Physiol.*— 1991.— Vol. 53.— P. 395—414.
52. Weaver T.E., Whitsett A. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins // *Biochem. J.*— 1991.— Vol. 273.— P. 249—264.
53. Yu S.-H., Possmayer F. Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant // *Ibid.*— 1986.— Vol. 236, № 1.— P. 85—89.

Поступила 14.02.96

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1996

УДК 616-002.182:612.013.1

*Г.Л.Зубович, А.К.Абрамовская, В.С.Камышников, И.М.Лаптева,
Л.К.Суркова, Н.С.Шпаковская, М.И.Дюсмикеева, Т.И.Шашкова*

ПОКАЗАТЕЛИ ГОМЕОСТАЗА У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

НИИ пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ, Минск

HOMEOSTATIC INDICES IN PULMONARY SARCOIDOSIS

*G.L.Zubovich, A.K.Abramovskaja, V.S.Kamyshnikov, I.V.Lapteva, L.K.Surkova, N.S.Shpakovskaja,
M.I.Dusjmikeeva, T.I.Shashkova*

Summary

In 69 patients with pulmonary sarcoidosis the following homeostatic indices were studied before and after treatment: parameters of immunological tests, peroxide lipid oxidation, enzyme antioxidant defence, hormonal profile. The considerable disorders of all chains in systemic immunity were revealed: attenuation of T-lymphocytes with their subpopulation discrepancy, decreasing levels of IgA, M, G and increasing level of fibronectin. Significant changes in bronchopulmonary lavage fluid were found: decrease of alveolar macrophages, increase in lymphocytes, neutrophils, fibronectin and secretory IgA. The intensification of peroxide lipid oxidation was accompanied by reduced antioxidant defense and pronounced hormonal disbalans was also marked. The criteria for differential diagnosis of pulmonary sarcoidosis and tuberculosis were elaborated.

Резюме

Исследованы особенности гомеостаза у 69 больных саркоидозом органов дыхания: динамика показателей системного иммунитета и местной защиты легких, антиоксидантной обеспеченности организма и гормонального гомеостаза до и после лечения. Установлено, что у больных саркоидозом значительно нарушены все звенья системного иммунитета (снижение количества Т-лимфоцитов с нарушениями на уровне отдельных субпопуляций, снижение уровней IgA, М, G и увеличение фибронектина (ФН). Обнаружено уменьшение содержания альвеолярных макрофагов, повышение количества лимфоцитов и нейтрофилов, а также ФН и секреторного IgA в бронхоальвеолярной жидкости. Со стороны