

Key words:	syndrome caused increasing of the total phospholipids, as well as favourable change in the phospholipid fractions of the alveolar surfactant.
Address for correspondence:	adult respiratory distress syndrome, alveolar surfactant, acute fecal peritonitis, ambroxol, sepsis, surfactant phospholipids
	<i>Simeon Lazarov, M.D., Ph.D., Department of Pathophysiology, Medical Faculty, Medical University, 2, Zdrave Str., Bg – 1431 Sofia, tel. +359 897 751 493</i>

ВЪВЕДЕНИЕ

Най-често респираторен дистрес-синдром при възрастни (РДСВ) се развива в случаите на Грам-негативен сепсис и септичен шок, които предимно са усложнение на острия фекален перитонит. В около 20% от случаите той се причинява от патологични процеси на дебелото черво (напр. дивертикулит, хроничен улцерохеморагичен колит, вътрелуменен карцином, инкарцерирана херния, волвулус и др.) с последваща перфорация [8, 9, 11, 14, 18, 20].

РДСВ протича в три стадия: ексудативен, стадий на увреждане на алвеоло-капиллярната стена и белодробната сърфактантна система и пролиферативен (хроничен) стадий. Основно патогенетично нарушение е увреждането на структурата и функцията на белодробната сърфактантна система – пневмоцити тип I и II, осмиефилни ламеларни телца, тубуларен миелин, миелинови фигури и алвеоларен сърфактант (AC) [1, 5, 6, 7, 23, 25]. При РДСВ се наблюдава повишено образуване на токсични метаболити на кислорода (ROS) и азота (RNS) от белодробните макрофаги (интерстициални и алвеоларни) и неутрофилните сегментоядрени гранулоцити. Образуваните свободни радикали отключват верижан процес на неензимна автопероксидация на полиненаситените мастнокиселинни остатъци на сърфактантните фосфолипиди. Веднъж започнал, този процес притежава свойството да се самоподдържа, което предизвиква бързо разрушаване на сърфактантните фосфолипиди [1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 23, 25].

Сред най-широко изследваните адювантни средства за лечение на РДСВ са антиоксидантите (напр. N-acetylcysteine, Ambroxol). При експерименталните и клинични проучвания са използвани различни подходи за елиминиране или намаляване на токсичните ефекти на високореактивните метаболити на кислорода (ROS) [водороден прекис (H_2O_2), супероксиден анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), хидроксилен радикал (HO^{\cdot}), пероксиден радикал (ROO^{\cdot}), гидропероксид ($ROOH$)] при остро белодробно увреждане и РДСВ. Фармакологичните механизми за повишаване на белодробната антиоксидантна защита са повишаване на запасите от антиоксидантни ензими (супе-

роксид-дизмутаза и каталаза), увеличаване на запаса от глутатион (N-ацетилцистеин, глутатион и др.) и прибавяне на нискомолекулни "прихващачи" (вит. Е, вит. С, амброксол и др.) [1, 10, 13, 15, 16, 23, 25].

Амброксолът [*trans*-4-(2-amino-3,5-dibromobenzylamino)-cyclohexane hydrochloride] е синтетичен нискомолекулен муколитик с антиоксидантно и сърфактант-стимулиращо действие. Като муколитично средство намалява вискозитета на храчките чрез понижаване секрецията от бронхиалните жлези и инхибиране реабсорбцията на NaCl от мукозните епителни клетки на въздухоносните пътища [13]. Основното фармакологично действие на амброксола обуславя широкото му използване в клиничната практика при болни с остър и хроничен бронхит, ХОББ, пневмонии, бронхиална астма, муковисцидоза и др.

Съвременни експериментални и клинични данни демонстрират терапевтична ефективност на амброксол при РДСВ [17, 20, 23]. Антиоксидантното действие на амброксола се изразява в прихващане и неутрализиране на токсичните за белите дробове и белодробната сърфактантна система (БСС) ROS, инхибиране образуването на неутрофилни инфилтрати в белодробния интерстициум и алвеолите, както и негативно модулиране на активността на белодробните макрофаги. Посредством описаните ефекти Ambroxol инхибира възпалителното увреждане на структурата и функцията на БСС и подпомага регенеративните процеси, стимулирайки синтеза и секрецията на сърфактант от пневмоцитите тип II [13].

Целта на настоящото изследване е да проучим ефектите на муколитичното лекарство с антиоксидантно действие Ambroxol върху септичен респираторен дистрес-синдром, като използваме експериментален модел на остър фекален перитонит у плъхове. В проучването бяха изследвани промяната в количеството на тоталните фосфолипиди (ТФЛ) и количественото разпределение на фосфолипидните фракции (сфингомиелин – СМ, фосфатидилхолин – ФХ, фосфатидилсерин – ФС, фосфатидилинозитол – ФИ, фосфатидилетаноламин – ФЕ, и фосфатидилглицерол – ФГ) на алвеоларния сърфактант.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментални животни

Експериментите бяха проведени върху 50 мъжки бели плъха от порода Wistar със средно тегло 180 ± 20 g. Животните бяха разделени в следните групи: I контролна (K1) (5 плъха, изследвани на 8-ия час), II контролна (K2) (5 плъха, изследвани на 12-ия час), I експериментална (E1) (10 плъха, изследвани на 8-ия час), II експериментална (E2) (10 плъха, изследвани на 12-ия час), III експериментална (E3) (10 плъха, третирани с Ambroxol и изследвани на 8-ия час) и IV експериментална (E4) (10 плъха, третирани с Ambroxol и изследвани на 12-ия час).

Фармакологични вещества

На плъховете от експерименталните групи E3 и E4 беше прилаган Ambroxol hydrochloride (Sigma-Aldrich, Germany).

Модел на остър фекален перитонит

Ние използвахме модел на остър експериментален фекален перитонит, описан от Шалимов и съавт. (1989) [6, 8, 9], като вместо цекална лезия, извършвахме лезия на colon descendens. Този модел е максимално сходен с човешката патология [11, 14, 18, 20], поради което е най-подходящ за експериментално моделиране на сепсис, септичен шок и септичен РДСВ.

Животните бяха оставени на глад 18 часа преди оперативната интервенция, като имаха свободен достъп до вода. След анестезия с Nembutal в доза 30 mg/kg т.м. i.p. на опитните животни (40 на брой) беше извършена долна средина лапаротомия с големина на разреза 2-2.5 cm [8, 10, 11]. След отваряне на коремната кухина и откриване на колон десценденс се извърши лезия на колона с размер 1-1.5 cm. Оперативната интервенция приключи с последващо послойно възстановяване на коремната стена. На контролните животни (10 на брой) се направи "лъжлива лапаротомия" – разрез с последващо послойно възстановяване на коремната стена без лезия на колона. След операцията животните бяха отвързани и оставени на свободен режим.

На 4-ия час след хирургичната интервенция на животните от експерименталните групи E3 и E4 въвеждахме Ambroxol в доза 10 mg/kg телесна маса i.p.

На 8-ия и 12-ия час плъховете от контролните и експерименталните групи бяха трахеотомирани след анестезия с Nembutal в доза 30 mg/kg т.м. i.p. След общата анестезия в трахеята на плъховете се фиксира пластмасова канюла, през която беше извършен бронхо-алвеоларен лаваж (БАЛ) с леден физиологичен серум четирикратно по 5 ml. Бронхо-алвеоларната лаважна

течност (БАЛТ) събирахме в предварително силиконизирани стъклени съдове за избягване полепването на БАЛТ компонентите към техните стени.

При планиране и провеждане на експериментите стриктно бяха спазвани Международните насоки и принципи за експерименти с животни.

Биохимични методи

Екстрахирахме липидите по метода на Folch et. al. [12]. Количественото определяне на сурфактантните фосфолипиди се извърши по метода на Stewart [19]. Екстинцията беше определяна с помощта на спектрофотометър (Specol). Фосфолипидните фракции на БАЛ определяхме чрез тънкослойна хроматография на silica gel 60 plates (Merck), като за разтворител използвахме смес хлороформ/метанол/изопропанол/0.25% KCl/триетиламин (30:9:25:6:18) [21].

Статистически методи

Получените експериментални данни бяха обработени статистически и представени като средни стойности \pm S.E.M посредством методите на дисперсионния анализ (one-way ANOVA). Статистическата достоверност бе установена с помощта на t-test на Student. За статистически достоверни се отчитаха резултатите с $P < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

Експерименталните резултати от количественото изследване на фосфолипидния състав и ТФЛ на АС са представени на табл. 1. Установено е статистически значимо понижаване на ТФЛ, СМ, ФХ, ФС, ФЕ и ФГ при опитните животни от групи E1 и E2. При опитните животни от група E1 се наблюдава увеличение на ФИ. При групи E3 и E4 се наблюдава статистически значимо повишаване на ТФЛ, СМ, ФХ, ФС, ФЕ и ФГ. ФИ намалява статистически при група E3, но се увеличава при E4.

Резултатите от изследването на процентното разпределение на фосфолипидните фракции на АС са представени на табл. 2. Експерименталните данни показват понижаване на СМ и ФГ и повишаване на ФХ при опитните животни от групи E1 и E2. ФС не се променя при E1, но се понижава при E2. ФИ се повишава при E1, но се намалява при E2. При животните от групи E3 и E4 се наблюдава повишаване на ФХ. СМ и ФС не се променят при E3, но се повишават при E4. ФИ се понижава при E3, но не се променя при E4. ФЕ не се променя и при плъховете от групи E3 и E4. ФГ остава понижен както при E3, така и при E4.

Получените резултати от изследването на количественото съотношение на фосфолипидните фракции на АС (ФХ/СМ, ФГ/ФИ и ФЕ/ФС) са

представени на табл. 3. Резултатите показват статистически значимо повишаване на съотношението ФХ/СМ и понижаване на съотношението ФЕ/ФС при опитните животни от групи Е1 и Е2. Съотношението ФГ/ФИ се понижават при живот-

ните от група Е1, но рязко се повишава при тези от Е2. Съотношението ФГ/ФИ намалява прогресивно, като тази промяна е най-изразена при Е4. Съотношението ФЕ/ФС се увеличава незначително при Е3, но се понижават при Е4.

Таблица 1. Ефекти на Амброхол върху фосфолипидния състав (μg ФЛ/ mg протеин; $\bar{x} \pm \text{Sx}$) на алвеоларния сърфактант върху пълхове с модел на септичен РДСВ

Фосфолипидни фракции на АС	Контролни пълхове (n = 10)	Опитни пълхове I група (n = 10)	Опитни пълхове II група (n = 10)	Опитни пълхове III група (n = 10)	Опитни пълхове IV група (n = 10)
СМ	75.60 \pm 1.20	53.58 \pm 1.40**	32.16 \pm 1.15**	60.49 \pm 1.32*	42.33 \pm 1.22*
ФХ	1137.60 \pm 20.00	1068.10 \pm 18.50*	1050.40 \pm 19.20*	1228.30 \pm 17.18**	1214.50 \pm 19.72**
ФС	65.20 \pm 0.90	52.80 \pm 1.30	38.98 \pm 0.52**	57.50 \pm 1.24*	54.50 \pm 1.31**
ФИ	31.15 \pm 0.80	41.00 \pm 0.95*	7.80 \pm 0.40**	35.20 \pm 0.30*	21.31 \pm 0.25*
ФЕ	70.24 \pm 2.20	39.85 \pm 1.29*	37.17 \pm 1.90**	43.71 \pm 2.20*	40.60 \pm 1.30**
ФГ	187.42 \pm 0.70	158.40 \pm 0.70**	125.02 \pm 2.20**	80.50 \pm 0.26**	90.32 \pm 1.60*
ТФЛ	1567.21 \pm 25.80	1413.73 \pm 24.33**	1274.53 \pm 26.22**	1505.70 \pm 22.32**	1463.56 \pm 25.40*

СМ – сфингомиелин, ФХ – фосфатидилхолин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФЕ – фосфатидилетанол-амин, ФГ – фосфатидилглицерол, ТФЛ – тотални фосфолипиди
Статистическа значимост спрямо контролата: *p < 0.01; **p < 0.001

Таблица 2. Процентно разпределение на фосфолипидните фракции на алвеоларния сърфактант у пълхове с модел на септичен РДСВ

Фосфолипидни фракции на АС	Контролни пълхове (n = 10)	Опитни пълхове I група (n = 10)	Опитни пълхове II група (n = 10)	Опитни пълхове III група (n = 10)	Опитни пълхове IV група (n = 10)
СМ	5	4	2	4	3
ФХ	73	75	81	82	83
ФС	4	4	3	4	4
ФИ	2	3	1	2	1
ФЕ	4	3	3	3	3
ФГ	12	11	10	5	6
ТФЛ	100	100	100	100	100

Таблица 3. Количествено съотношение между основните фосфолипидни фракции (μg ФЛ/ mg протеин; $\bar{x} \pm \text{Sx}$) на алвеоларния сърфактант у пълхове с модел на септичен РДСВ

Съотношения между фосфолипидните фракции на АС	Контролни пълхове (n = 10)	Опитни пълхове I група (n = 10)	Опитни пълхове II група (n = 10)	Опитни пълхове III група (n = 10)	Опитни пълхове IV група (n = 10)
ФХ/СМ	15.05 \pm 1.66	19.93 \pm 1.36**	32.66 \pm 1.68**	20.30 \pm 1.21	28.69 \pm 1.31*
ФГ/ФИ	6.02 \pm 0.87	3.86 \pm 0.73*	16.03 \pm 0.55**	2.29 \pm 0.53	4.24 \pm 0.42**
ФЕ/ФС	1.08 \pm 0.23	0.75 \pm 0.51*	0.95 \pm 0.63*	0.76 \pm 0.30	0.74 \pm 0.20*

Статистическа значимост спрямо контролата: *p < 0.01; **p < 0.001

ОБСЪЖДАНЕ

В нашето изследване установихме динамични промени (на 8-ия и 12-ия час) в биохимичния състав на сърфактантните фосфолипиди при пълховете със септичен РДСВ. Поради намаленото количество на СМ, ФХ, ФС, ФЕ и ФГ (на 8-ия и 12-ия час) се наблюдава прогресивно намаление на ТФЛ както на 8-ия, така и на 12-ия час. Успоредно с това настъпва повишаване на ФИ на 8-ия час и значително понижаване на ФИ на 12-ия час. Установяват се промени и в про-

центното разпределение на фосфолипидните фракции на АС, които са свързани с описаните по-горе биохимични нарушения. Намалява относителният дял на СМ и ФГ (на 8-ия и 12-ия час), ФИ (само на 8-ия) и на ФС (само на 12-ия час). Успоредно на тези нарушения настъпва повишаване на относителния дял на ФХ (на 8-ия и 12-ия час) и на ФИ (само на 12-ия час).

Промените в количеството и процентното разпределение на сърфактантните фосфолипиди водят до нарушения и в количественото съотношение на

фосфолипидните фракции. ФХ/СМ се повишава, а ФЕ/ФС се понижава, както на 8-ия, така и на 12-ия час. ФГ/ФИ се понижава на 8-ия, но рязко се повишава на 12-ия час.

Амброксолът притежава антиоксидантен, сърфактант-стимулиращ и противовъзпалителен ефект. Изследвания *in vitro* демонстрират капацитет на амброксол да инхибира реакциите, медирирани от HO° и HOCl , както и да предотвратява пероксидационните повреди на линоленовата киселина, индуцирани чрез системата $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe(феройони)-EDTA}$ [13]. Допуска се, че поне два механизма са отговорни за осъществяване на тези ефекти на амброксола: 1) директно да прихваща HO° и 2) способността му чрез двата азотни атома в неговата молекула да бъде хелатор на желязото [10, 13, 15, 16, 23, 25]. Освен това амброксолът намалява бронхиалната хиперреактивност и стимулира продукцията на белодробен сърфактант [13].

Амброксолът е негативен модулатор на функцията на фагоцитите (сегментоядрени гранулоцити, моноцити и макрофаги), като инхибира спонтанната им миграция, химиотаксиса и секрецията на възпалителни медиатори, включително на тумор-некротизиращ фактор ($\text{TNF}\alpha$), интерлевкин-1-алфа и бета ($\text{IL-1}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$). Освен това действа като активен модулатор на вътреклетъчния калций [10, 13, 15, 16, 23, 25]. Амброксолът стимулира синтеза и секрецията на сърфактант от пневмоцитите тип II и повишава съотношението ФХ/СМ [15].

Амброксолът повишава ТФЛ, СМ, ФХ, ФС и ФЕ. Ефектите на амброксол се запазват както в началото, така и в по-късните етапи от патогенезата на РДСВ. Предполага се, че ефектите на амброксол върху белодробната сърфактантна система се дължат, от една страна, на мощния му антиоксидантен ефект, а от друга, на неговата способност да стимулира синтеза и секрецията на сърфактант.

Библиография

1. Драганов, В. и С. Лазаров. Респираторен дистрес синдром при възрастни. – *Вътр. бол.*, 32, 2000, № 3, 19-28.
2. Драганов, В. и др. Сепсис и септичен шок. – *Обща мед.*, 3, 2001, № 1, 15-32.
3. Лазаров, С., М. Балуцов, Е. Янев. Ролята на бактериалните ендотоксини, техните рецептори и цитокините в патогенезата на септичния (ендотоксинов) шок. – *Бълг. мед.*, 8, 2000, №4, 7-14.
4. Лазаров, С., М. Балуцов, Е. Янев. Ролята на клетъчните адхезионни молекули и провъзпалителните медиатори в патогенезата на ендотоксиновия респираторен дистрес синдром. – *Вътр. бол.*, 32, 2000, № 4, 18-24.
5. Лазаров, С., М. Балуцов и Е. Янев. Пулмонална репарация след респираторен дистрес синдром при възрастни. – *Вътр. бол.*, 32, 2001, № 4, 39-44.
6. Янев, Е. Проучвания върху белодробната сърфактантна система в експерименталната медицина. – *Хабилитационен труд*, София, 1996.
7. Янев, Е. и М. Балуцов. – *Илюстрирана патологична физиология*. С., МИ "Арсо", 2000, 913-928.
8. Шалимов А. А., В. И. Шапошников и М. Г. Пинчук. *Остры перитонит*, Киев, 1981, 265-270.
9. Шалимов, С. А., А. П. Радеховский и Л. В. Кейсевич. *Руководство по экспериментальной хирургии*. Москва, Медицина, 1989.
10. Artigas, A. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS, Part 2. Ventilatory, Pharmacologic, Supportive Therapy, Study Design Strategies, and Issues Related to Recovery and remodeling. – *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, 1998, 1332-1347.
11. Bartlett, J. et al. Therapeutic efficacy of 29 antimicrobial regimens in experimental intraabdominal sepsis. – *Rev. Infect. Dis.*, 3, 1981, 535-542.
12. Folch, J., M. Olees et G. H. Slooane-Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. – *J. Biol. Chem.*, 226, 1947, 497-509.
13. Gillissen, A., D. Nowak. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol on anti-oxidant therapy. – *Respir. Med.*, 92, 1998, № 4, 609-623.
14. Gorbach, S. L. Intestinal microbial. – *Gastroenterol.*, 60, 1971, 1110-1117.
15. Hudson, L. D. New Therapies for ARDS. – *Chest*, 108, 1995, № 2, 79-87.
16. Said, S. I. et H. D. Foda. Pharmacologic modulation of lung injury. – *Am Rev. Respir. Dis.*, 139, 1989, 1553-1564.
17. Su, X. et al. Inhibition of respiratory responses by ambroxol, a mycolytic agent, in a murine model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. – *Int. Care Med.*, 30, 2004, № 1, 133-140.
18. Schwartz, S. L. et al. *Principles of Surgery*. New York, McGraw-Hill, 1999, 1521-1531.
19. Stewart, J. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate. – *Anal. Biochem.*, 104, 1980, № 1, 10-14.
20. Taylor, M. B. *Gastrointestinal Emergencies*. Baltimore, Williams & Williams, 1992, 713-723.
21. Touchstone, J., C. Chen et K. Beaver. Improved separation of phospholipids by thin layer chromatography. – *Lipids*, 15, 1980, 61-62.
22. Ulas, M. M. et al. Protective effect of ambroxol on pulmonary function after cardiopulmonary bypass. – *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 52, 2008, № 6, 518-523.
23. Ware, L. B. et M. A. Matthay. Acute respiratory distress syndrome. – *N. Engl. J. Med.*, 342, 2000, № 18, 1337-1349.
24. Wauer, R. R. et al. Randomized double blind trial of Ambroxol for the treatment of respiratory distress syndrome. – *Eur. J. Pediatr.*, 151, 1992, 357-363.
25. Wiedemann, H. P. et D. Y. Tai. Adult respiratory distress syndrome (ARDS): current management, future directions. – *Clev. Clin. J. Med.*, 64, 1997, № 7, 365-373.

Постъпила за печат на 30 юни 2011 г.