

**БИОХИМИЧНИ И БИОФИЗИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА БРОНХОАЛВЕОЛАРНА
ЛАВАЖНА ТЕЧНОСТ ОТ ПАЦИЕНТ С БЕЛОДРОБНА АЛВЕОЛАРНА
ПРОТЕИНОЗА**

М. Бангъзова*, Е. Лонтова, А. Цанова***, Е. Стоименова***, А. Йорданова***,
С. Илчева****, В. Илиева****, Й. Ямакова*****, З. Лалчев***

* *Биологически Факултет, СУ „Св. Кл. Охридски”, 1164 София, България*

** *Химически Факултет, СУ „Св. Кл. Охридски”, 1164 София, България*

*** *Медицински Факултет, СУ „Св. Кл. Охридски”, 1402 София, България,
albena@biofac.uni-sofia.bg*

**** *Медицински Факултет, Медицински университет, 1431 София, България*

**** *КАИЛ, СБАЛББ. “Св. София”, 1431 София, България*

**BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL STUDIES OF BRONHOALVEOLAR LAVAGE
FLUID FROM A PATIENT WITH LUNG ALVEOLAR PROTEINOSIS**

M. Bangyozova*, E. Lontova, A. Tsanova***, A. Jordanova***, E. Stoimenova***,
S. Pcheva****, V. Ilieva****, Y. Yamakova*****, Z. Lalchev***

* *Faculty of Biology, Sofia University “St. Kl. Ohridski”, 1164 Sofia, Bulgaria*

** *Faculty of Chemistry, Sofia University “St. Kl. Ohridski”, 1164 Sofia, Bulgaria*

*** *Faculty of Medicine, Sofia University “St. Kl. Ohridski”, 1407 Sofia, Bulgaria*

**** *Faculty of Medicine, Medical University, 1431 Sofia, Bulgaria*

**** *Department of anesthesiology and intensive care, University hospital of pulmonary diseases,
1431, Sofia, Bulgaria*

ABSTRACT

The pulmonary alveolar proteinosis (PAP) is a rare disease of unknown etiology characterized by intraalveolar accumulation of lipoproteinaceous material in the lung. The aim of the present study was to compare the biochemical and biophysical characteristics of tracheal aspirates from a patient with PAP, during the whole lung lavage (WLL) taken after each stage of the procedure. For this purpose the proteins and the phospholipids (PLs) concentrations of the samples were determined. In addition, by using the pending drop method, the equilibrium surface tension characterizing the functionality of the alveoli was measured. Our results showed that during the five-time lung lavage as suspected the protein and phospholipids content was decreased and consequently the equilibrium surface tension was increased as a result of the decreased phospholipids-protein ratio. After WLL the physiological condition of the patient was improved; therefore it would be of an interest to monitor these parameters 72 hours after the procedure.

Keywords: *Alveolar proteinosis, Lung surfactant, Method of pending drop, Surface tension*

УВОД

Белодробната алвеоларна протеиноза (БАП) е дифузно белодробно заболяване, което се характеризира с натрупване на белодробен сърфактант в алвеолите [3]. Секретираният на въздушно-водната фазова граница сърфактант има средно време на полуживот около 36 часа. Той се метаболизира от макрофагите или се реадсорбира обратно в субфазата от пневмоцити тип II. До 90% от главния сърфактантен фосфолипид – дипалмитоилфосфатидилхолин се рециклира от алвеоларното пространство към пневмоцити тип II, като това се осъществява чрез рецептор-медирана сигнализация, активирана от специфичният сърфактантен протеин SP-A и клатрин-зависима ендоцитоза, а останалите 10% се разграждат от алвеоларните макрофаги [4].

Известни са три форми на БАП: вродена, идиопатична (първична) и вторична. При вродената форма е налице дефицит на специфичния сърфактантен протеин В (SP-B), отговорен заедно със сърфактантните липиди за поддържане на ниските стойности на повърхностното напрежение в динамичните условия на вдишане/издишане. Известно е, че двата хидрофобни, специфични за алвеоларния сърфактант, протеини - SP-B и SP-C стимулират метаболизма и обратното поемане на сърфактантните липиди от алвеоларните клетки тип II [11]. Решаващото значение на SP-B за функционирането на белия дроб се потвърждава от факта, че новородени, при които липсва SP-B поради генетичен дефект, развиват тежък РДС с летален изход [8]. Генезата на идиопатичната БАП е автоимунна – образуват се анти-GM-CSF антитела (GM-CSF – Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), което се наблюдава при 90% от случаите и е свързано с нарушаване на функцията на алвеоларните макрофаги, водещо до дефект в сърфактантната хомеостаза и затруднено разграждане на сърфактанта [12]. Вторичната форма на това тежко заболяване се наблюдава при някои хематологични, злокачествени или имунодефицитни заболявания [7].

БАП е рядко заболяване с честота средно 1/1 000 000 и засяга предимно мъже в средна възраст (м:ж 3:1). Началото на заболяването е атипично, с продължителен латентен период, което забавя диагнозата месеци и години [3]. Повечето от болните се оплакват от задълбочаващо се затруднение в дишането с/без суха кашлица. Те са податливи на инфекции – в това число причинени от микобактерии, *Aspergillus sp.*, *Pneumocystis carini*, *Nocardia sp.* и т.н. Рентгенографски се наблюдават двустранни алвеоларни засенчвания, наподобяващи белодробен оток и ангажиращи предимно долните белодробни полета [15]. Клиничното протичане варира от спонтанна ремисия до остра дихателна недостатъчност.

Цялостният белодробен лаваж (ЦБЛ) за терапия и лечение на БАП е въведен от Jose Ramirez-Rivera през 1960 г. и остава и до сега основен утвърден метод при случаи на протеиноза [10]. При тази процедура неколкостранно се прави лаваж на белия дроб с физиологичен разтвор, в резултат на което натрупания протеиногенен материал се отмива, като се редуцира и титъра на анти-GM-CSF антителата. През годините терапията непрекъснато се усъвършенства и днес рутинно се прилага под обща анестезия, обемите на използвания физиологичен разтвор се увеличават, лаважът се комбинира с перкусия и масаж на гръдната стена [1, 5, 13].

Целта на представената работа е да се анализира бронхоалвеоларна лаважна течност (БАЛТ) на пациент, страдащ от БАП, като се сравнят биохимичните и биофизичните характеристики на проби, взети по време на отделните етапи на прилаганата ЦБЛ. Определена е белтъчната и фосфолипидната концентрация в БАЛТ. В допълнение, посредством метода на висящата капка, изискващ минимален обем на изследвания разтвор, е измерена равновесната стойност на повърхностното напрежение на всяка от изследваните проби.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Събиране на проби от ЦБЛ: От пациент от мъжки пол са събрани средни проби от 15 - за десния и 16 - за левия бял дроб, цикъла на лаваж. Процедурата е осъществена първоначално на десния бял дроб на пациента, а след 7 дни и на левия. Пробите, анализирани в проведеното изследване, са получени както следва:

- ✓ **проба 1:** средна проба след лаваж на съответния бял дроб с физиологичен разтвор с начален обем 1 l (10 ml/kg); краен обем на получената лаважната течност от десния и левия бял дроб съответно 0.8 l и 1 l.
- ✓ **проба 2:** продължение на първия лаважен цикъл - към проба 1 са добавени 3 x 1 l 0.9 % NaCl; краен обем на пробата 4 l.
- ✓ **проба 3:** нов лаважен цикъл с 4 x 1 l 0.9 % NaCl; краен обем на лаважната течност 4 l.
- ✓ **проба 4:** нов лаважен цикъл с 4 x 1 l 0.9 % NaCl; краен обем на лаважната течност 4 l.

✓ проба 5 нов лаважен цикъл за левия бял дроб с 3 x 1 l 0.9 % NaCl, а за десния дроб – с 3 x 1 l 0.9 % NaCl; краен обем на лаважната течност е съответно 2 l и 3 l.

Определяне на белтъчната концентрация: За определяне на белтъчното съдържание в бронхоалвеоларната лаважна течност от всяка проба са взети по 1 ml и посредством модифициран метод на Lowry е определено количеството тотален белтък [9].

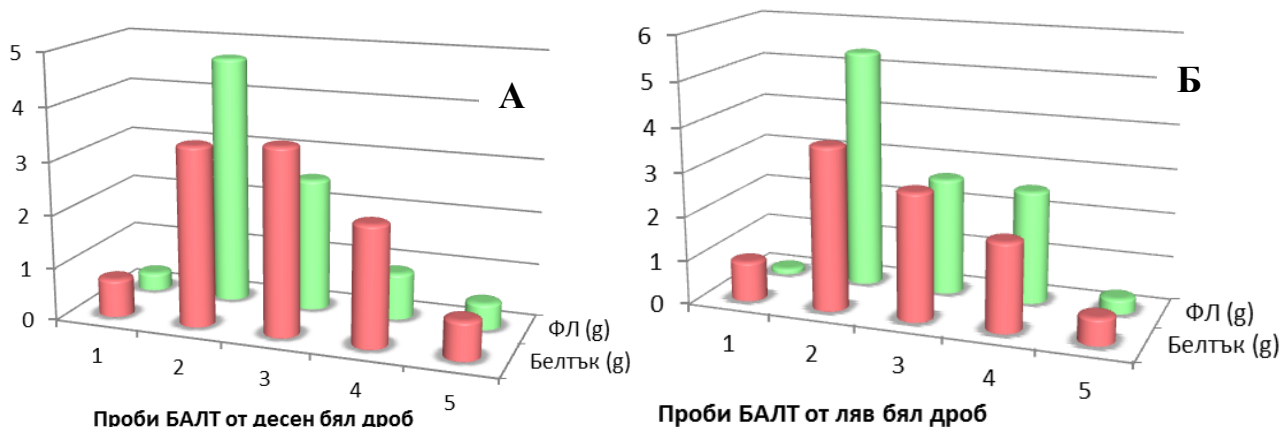
Определяне на фосфолипидната концентрация: Фосфолипидите (ФЛ) в изследваните проби са екстрахирани по метода на Bligh&Dyer [2]. Количествения анализ на ФЛ е извършено по метода на Каховкова за определяне на неорганичен фосфат [6].

Методът на висящата капка позволява да се изследва повърхностното поведение на малки количества от лаважните течности (обемът на изследваните проби е 50 µl). Използван е тензиометър KSV CAM 101 (KSV Instruments Ltd., Finland) за експериментален осевосиметричен анализ на висяща капка. След формиране на симетрична капка се изчаква 15 минути, като това време е необходимо за адсорбция на повърхностно-активните молекули на въздушно-водната фазова граница и достигане на равновесна стойност на повърхностното напрежение $\gamma_{\text{equilibrium}}$ (γ_{eq}) (mN/m). Чрез камера, свързана с апаратурата, се заснемат серия снимки с различна скорост (от 60 до 300 снимки в минута) и по промяната на формата на капката с помощта на вграден софтуер се отчитат характеристичните повърхностни параметри.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

В представената работа са изследвани с помощта на биохимични и биофизични методи проби от бронхоалвеоларна лаважна течност на пациент с белодробна алвеоларна протеиноза, взети по време на отделните етапи на прилаганата процедура.

Влошената дихателна функция при протеиноза се дължи на инактивиране на алвеоларния сърфактант от увеличеното количество протеини (албумин, фибриноген и т.н.), като в най-голямо количество е плазмения албумин. Известно е, че при остър респираторен дистрес синдром, концентрацията на албумин в алвеоларната течност достига 25-100 mg/ml. Счита се, че в резултат на високата му скорост на адсорбция и концентрация (както и на останалите плазмени протеини), той се разтича върху алвеолите по-бързо, в сравнение с белодробния сърфактант, формирайки протеинов филм. Този филм покрива повърхността на алвеолите, правейки я недостъпна за сърфактанта [14].



Фигура 1. Тотално количество на белтъци и фосфолипиди в изследваните средни проби бронхоалвеоларна лаважна течност, събрани от лев бял дроб (панел А) и десен бял дроб (панел Б).

Биохимичният анализ включва определяне на белтъчна и ФЛ концентрация в БАЛТ. Получените резултати показват, че след началното вливане на 1 l физиологичен разтвор (проба 1, фиг. 1 - панели А и Б), където не се прилага вибрационен масаж на гърдната стена,

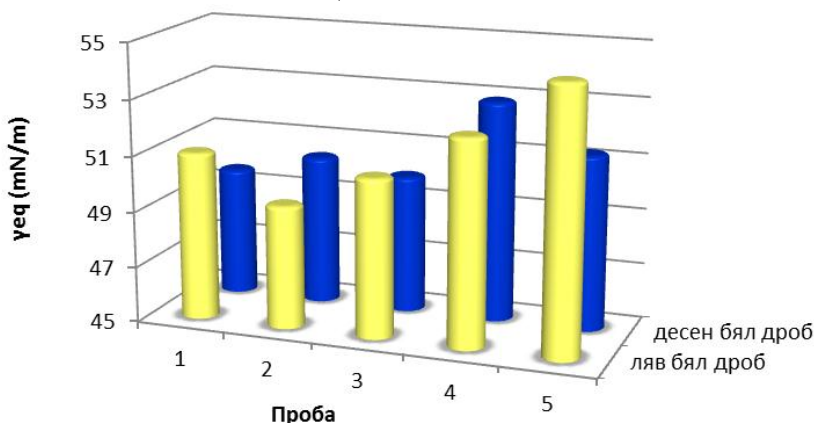
в бронхоалвеоларния лаваж на пациента са установени ниски концентрации, както на белтъци, така и на фосфолипиди. При последващото вливане на нови 3 x 1 l физиологичен разтвор в получената БАЛТ се отделят значителни количества от натрупалите се, в резултат на протеинозата, белтъци и ФЛ. От десния бял дроб в крайния обем лаваж от 4 l са отмити 3,4 g протеини и 4,7 g фосфолипиди, а от левия бял дроб – 3,7 g протеини и 5,4 g фосфолипиди (Фигура 1). При следващите цикли на прилагане на ЦБЛ тези стойности постепенно се понижават, като тоталното количество на отделения белтък в общия обем лаваж достига до над 10 грама за всеки лоб на белия дроб (Таблица 1).

Таблица 1. Обща концентрация на белтъци, фосфолипиди и отношение ФЛ/протеини в анализирани проби БАЛТ от десен и ляв бял дроб.

проба	Десен бял дроб			Ляв бял дроб		
	Белтък, g	ФЛ, g	ФЛ/белтък	Белтък, g	ФЛ, g	ФЛ/белтък
1	0.7	0.3	0.43	0.9	0.1	0.11
2	3.4	4.7	1.38	3.7	5.4	1.46
3	3.5	2.5	0.72	2.9	2.7	0.93
4	2.3	0.9	0.39	2.0	2.6	1.30
5	0.7	0.5	0.71	0.6	0.3	0.50
Общо количество, g	10.6	8.9	0.84	10.1	11.1	1.10

Литературни данни сочат, че съотношението между фосфолипидите и протеините в състава на алвеоларния сърфактант е 9:1. Резултатите от направения биохимичен анализ показват драстична промяна на този параметър, като съотношението силно намалява до стойности под 1, в резултат на силно повишената концентрация на протеини в белия дроб (Таблица 1). В допълнение, сравнението между биохимичните параметри при десния и при левия бял дроб на пациента показват по-високо количество на протеини и съответно пониски стойности на съотношението ФЛ/протеини при десния лоб. Тези резултати се потвърждават и от изследванията на пациента, посредством образна диагностика, които показват влошаване на състоянието на десния лоб, в сравнение с резултатите за левия бял дроб (резултатите не са представени).

Освен проведения биохимичен анализ, посредством метода на висящата капка, изискващ минимален обем на изследвания разтвор, е измерена равновесната стойност на повърхностното напрежение на всяка от изследваните проби, получени след прилагане на съответния етап на ЦБЛ.



Фигура 2. Равновесни стойности на повърхностното напрежение (mN/m) на изследваните проби бронхоалвеоларна лаважна течност, събрана от ляв и десен бял дроб.

От резултатите, представени на Фигура 2 се вижда, че след началното вливане на 1 l физиологичен разтвор (проба 1, фиг. 2), при пробите от левия бял дроб се забелязва тенденция към повишаване на стойностите на γ_{eq} , което съответства на понижено ФЛ

съдържания в тях. При по-влошения десен дроб обаче, това повишение в изследвания биофизичен параметър, не е така ясно изразено. Известно е, че за нормалното функциониране на алвеоларния сърфактант е необходимо оптимално съотношение между ФЛ и белтъците и по-ниски стойности на равновесно повърхностно напрежение. Очевидно е, че при наблюдавания случай на БАП, това съотношение е силно нарушено, особено при десния бял дроб.

Резултатите от проведения биохимичен и биофизичен анализ на пробите БАЛТ потвърждава ефикасността на прилаганата от години процедура за лечение на белодробна алвеоларна протеиноза. От особен интерес ще представлява по-нататъшно изследване на анализирания параметри 72 часа след провеждане на процедурата и възможността за възстановяване на оптималния състав на алвеоларния сърфактант.

Благодарности: Изследванията са финансирани по проект №46/2013 г. на СУ «Св. Кл. Охридски».

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Beccaria, M., M.Luisetti, G. Rodi, A. Corsico, M.C. Zoia, S. Colato, P. Pochetti, A. Braschi, E. Pozzi, I. Cerveri, 2004. Long-term, durable benefit after whole lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis, *European Respiratory Journal*, 23, 536–531.
2. Bligh, E.G., W.J. Dyer, 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
3. Campo, I., Z. Kadija, F. Mariani, E. Paracchini, G. Rodi, F. Mojoli, A. Braschi, M. Luisetti, 2012. Pulmonary alveolar proteinosis: diagnostic and therapeutic challenges, *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 7, 4.
4. Crowther, J.E., L.S. Schlesinger, 2006. Endocytic pathway for surfactant protein A in human macrophages: binding, clathrin-mediated uptake, and trafficking through the endolysosomal pathway, *American Journal of Physiology- Lung Physiology*, 290, 334-342.
5. Indira, K., V. Rajesh, V. Darsana, U. Ranjit, Jiju John, S.P. Vengadkrishnaraj, S. Dharmadhikari, 2007. Whole Lung Lavage: The Salvage Therapy for Pulmonary Alveolar Proteinosis, *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, 49, 41-44.
6. Kahovkova, J., H. Odavic, 1969. A simple method for analysis of phospholipids separated on thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography*, 40, 90-95.
7. Mazzone, P., M.J. Thomassen, M. Kavuru, 2013. Our new understanding of pulmonary alveolar proteinosis: What an internist needs to know, *Cleveland clinic journal of medicine*, 68, 977-993.
8. Noguee, L. M., D. E. deMello, L. P. Dehner, H. R. Colten, 1993. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *New England Journal of Medicine*, 328, 406-410.
9. Peterson, G. L., 1983. Determination of total protein, *Methods of Enzymology*, 91, 95-119.
10. Ramirez, R.J. 1966. Bronchopulmonary lavage: new techniques and observations. *Dis Chest*, 50, 581–588.
11. Rice, W. R., V. K. Sarin, J.L. Vox, J. Baatz, S. Wert, J.A. Whitsett, 1989. *BBA*, 1006, 237-245
12. Seymour, J.F., J.J.Presneill, O.D.Schoch, G.H. Downie, P.E. Moore, I.R. Doyle, J.M. Vincent, K. Nakata, T. Kitamura, D. Langton, M.C. Pain, A.R. Dunn, 2001. Therapeutic efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with idiopathic acquired alveolar proteinosis. *Am J Respir Care*, 163, 524–531.
13. Webb, S.T., A.J.R. Evans, A.J. Varley, A.Klein, 2008. Anaesthesia for serial whole lung lavage in a patient with severe pulmonary alveolar proteinosis: a case report. *Journal of Med Case Reports*, 2, 360-363.

14. Zasadzinski, J.A., T.F. Alig, C. Alonso, J.B. de la Serna, J. Perez-Gil, H.W. Tausch, 2005. Inhibition of pulmonary surfactant adsorption by serum and the mechanisms of reversal by hydrophilic polymers: theory, *Biophys. J.*, 89, 1621–1629.

15. Стенева Й., С. Алексов, Р. Петков, Д. Костадинов, Вл. Станоев, 2011. Цялостен белодробен лаваж за лечение на белодробна алвеоларна протеиноза. *Наука Пулмология*, 1, 26-29.