

Анотація

Шаповалова А.С. Морфофункціональні особливості розвитку пневмосклерозу при хронічній пневмонії та пошук ефективних шляхів його лікування.—

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». – Інститут фізіології ім. О. О.

Богомольця НАН України, Київ, 2023.

Дисертація присвячена визначенню морфо-функціональних особливостей розвитку пневмосклерозу при хронічній пневмонії та пошуку ефективних шляхів його лікування. З використанням морфо-метричних та функціональних методів дослідження було визначено особливості формування та наслідків розвитку пневмосклерозу при хронічній пневмонії. Не дивлячись на значні успіхи досягнуті людством у лікуванні пневмонії та її ускладнень, це захворювання продовжує розглядатись як стан, що загрожує життю пацієнта і є головною причиною смерті серед інфекційних хвороб. Одним із наслідків нелікованої пневмонії, особливо хронічної, є легеневий фіброз, що призводить до порушень газообміну й еластичності ураженої ділянки. Розробка нових методів його лікування є справжнім викликом для сучасної науки і медицини. Дві головні перешкоди на шляху пошуку і розробки новітніх методів терапії - є наше обмежене розуміння механізмів виникнення пневмофіброзу при хронічній пневмонії й шляхів його лікування. Пневмофіброз - це хронічне прогресуюче захворювання легень, що характеризується потовщенням фіброзних альвеолярних стінок, що призводить до порушення газообміну, обмеження дихальних шляхів і, як наслідок, дихальної недостатності. Розвиток фіброзу легень є переважно наслідком перенесеного запалення легень, викликаного широким спектром етіологічних факторів, що є результатом нелікованої (самовилікованої), недолікованої або хронічної пневмонії. Незважаючи на тривалу історію вивчення та гарне висвітлення проблеми у науковій літературі, ефективні терапевтичні підходи до лікування фіброзу легень нині відсутні. Отже, вивчення механізмів, що лежать в основі переходу запалення легень до легеневого фіброзу, а також пошук нових маркерів та перспективних терапевтичних мішеней для запобігання розвитку легеневого фіброзу залишаються дуже актуальними завданнями. Робота складалася з двох напрямків – експериментального та клінічного. Перший напрямок (експериментальний) передбачав дослідження ефекту застосування фосфоліпідів у ліпосомальній формі (препарат «Ліпін») та активатору мітохондріальних АТФ-залежних K⁺-каналів (уридин) в динаміці лікування хронічної пневмонії, що супроводжується розвитком пневмосклерозу. Другий напрямок (клінічний) передбачав порівняння ефективності лікування пацієнтів з дихальною недостатністю, викликану рестриктивною патологією легень, яким додатково до традиційного лікування використовували інгаляційне введення фосфоліпідів, та пацієнтів, які отримували тільки традиційне лікування. Крім того, досліджувались морфометричні показники легеневої тканини померлих пацієнтів та пацієнтів оперованих з приводу серцево-легеневої патології, що в анамнезі мали затяжні пневмонії. Для виконання першого напрямку дослідження було відібрано 98 щурів-самців лінії Вістар масою 250-270 г. Щури утримувалися в стандартних умовах та отримували стандартний раціон, що кількісно та якісно забезпечував їх фізіологічні потреби. Тваринам моделювали експериментальну пневмонію за методикою А.М. Кулик, шляхом введення в кожен легень по 0,5 мл нестерильної води, підігрітої до 70 °С.

Експериментальні тварини були розподілені на групи. В подальшому в якості коригуючих засобів застосовували екзогенно введені фосфоліпіди у ліпосомальній формі (Ліпін®) та активатор мітохондріальних АТФ-залежних K^+ -каналів уридин відповідно для 1 та 2 групи. Обстеження проводили на 5, 9, 12 добу та через 4 та 6 тижнів розвитку експериментальної пневмонії для оцінки ефективності фосфоліпідів та на 5, 9, 12 добу та через 1 та 2 місяці для оцінки впливу уридину на морфо-функціональний стан легень. При моделюванні експериментальної пневмонії відбуваються суттєві порушення аерогематичного бар'єру легень, найбільш виражені на 4-у добу від початку захворювання. Спостерігався некроз і десквамація альвеолярного епітелію з утворенням в просвіті альвеол гомогенних плівок типу гіалінових мембран. В цей період товщина аерогематичного бар'єру зростала з 163 ± 8 до 400 ± 28 нм, тобто у 2,5 рази, з поступовим зменшенням даного показника до 12-ї доби експериментальної пневмонії. Спостерігали деструкцію клітинних органел, особливо мітохондрій (МХ): їх набухання, розплавлення крист, вакуолізація, порушення цілісності як внутрішньої так і зовнішньої мітохондріальних мембран, що характеризує погіршення, а часто і нездатність МХ забезпечувати адекватну енергопродукцію. Збільшувалася кількість лізосом, особливо вторинних, які щільно прилягали до МХ, що прийнято вважати ознакою активації дегенеративних процесів в МХ і перенапруження їх функцій відносно енергозабезпечення тканини. Виявлялася практично повна відсутність сурфактанту (СФ) будь якого різновиду. Лише на 12-у добу мала місце поява незначної кількості СФ в порожнині альвеол при збереженні майже повного спустошення ламелярних тілець у пневмоцитах II типу. Через 4-и тижні нелікованої експериментальної пневмонії спостерігалася наявність значної кількості колагенових волокон в стромі легень, а також ділянки гіалінозу. Є підстави говорити про «сполучнотканинне переродження» легень. При цьому прояви набряку тканини легень виявлялись слабо. МХ сильно видозмінені: відзначається їх деструкція, вакуолізація, просвітлення матриксу та дисконкомплексція крист. Лізосом мало, вони переважно первинні, що не характерно для станів, які супроводжуються деструктивними процесами. На 6-му тижні експериментальної пневмонії зберігалися прояви пневмосклерозу, мало місце значне проростання колагенових волокон в стромі і міжальвеолярних перетинках, причому іноді спостерігалися ділянки деструкції самих колагенових волокон, що можна розглядати як поглиблення деструктивних процесів з подальшим розвитком пневмоцирозу. Що стосується МХ, то їх суттєві зміни зберігалися. В дисертаційному дослідженні було продемонстровано, що позитивний вплив фосфоліпідів на ультраструктуру тканини легень сприятливо впливає на функцію зовнішнього дихання и газообміну у експериментальних тварин. Це відбувається за рахунок нормалізації відношення альвеолярної вентиляції до хвилинного об'єму дихання, кисневого ефекту дихального циклу та попередження розвитку внутрішньоальвеолярного набряку легень, відновлення товщини аеро-гематичного бар'єру та стану мітохондріального апарату клітин. Слід зазначити, що препарат зменшує прояви пневмосклерозу, причому зниження інтенсивності проростання колагенових волокон може завдячувати або первинному зменшенню появи нових волокон, або вторинному зникненню колагенових волокон за рахунок компенсаторних механізмів і утворенню нативної легеневої тканини. В роботі вперше було показано, відмінності впливу уридину на функцію зовнішнього дихання (тобто, вирогідно, і на активність мітохондріального АТФ-залежного K^+ -

канала) при експериментальній пневмонії в залежності від початку його застосування. Використання уридину на початку захворювання чинить стимулюючий вплив, позитивно впливає на енергетичний метаболізм та оксидантно-прооксидантну систему, однак його введення в більш пізні терміни пригнічує функції дихальної системи, що, певно, в подальшому може посилюватись. Для реалізації другого напрямку дослідження було проаналізовано морфологічні та морфометричні зміни легеневої тканини померлих пацієнтів, що в анамнезі мали затяжні пневмонії та у пацієнтів оперованих з приводу серцево-легеневої патології, які також в анамнезі мали затяжні пневмонії, що призвели до утворення пневмосклерозу. Забір гістологічного матеріалу проводився у 6 померлих чоловіків віком від 49 до 81 року. Також досліджувалось 5 біоптатів легеневої тканини чоловіків віком від 42 до 74 років. При дослідженні змін ультраструктури тканини легень померлих пацієнтів, смерть яких була викликана або супроводжувалась дихальною недостатністю, можна було побачити наявність плівок в порожнині альвеол таких, як мають місце у гострому періоді експериментальної пневмонії. До того ж спостерігався масивний пневмосклероз, коли ділянки легень майже повністю займали колагенові волокна, і природно зі зруйнованими або вакуолізованими МХ. Подібні ультраструктурні зміни тканини легень, відзначені нами при експериментальній пневмонії, спостерігалися у осіб з хронічним перебігом пневмонії та дихальною недостатністю. Однак встановлено, що такі зміни є більш вираженими, особливо щодо формування пневмосклерозу. Така динаміка цілком зрозуміла з урахуванням більшої тривалості захворювання в порівнянні з експериментом. У обстежених пацієнтів в середньому >50% поля зору заповнене колагеновими волокнами. Проведено порівняння динаміки змін показників зовнішнього дихання у пацієнтів з пневмонією. Дослідну групу склали 48 чоловіків, контрольну – 20 чоловіків. Вік пацієнтів був від 25 до 40 років. Чоловікам дослідної групи, крім традиційного лікування пневмонії (антибіотикотерапія препаратами широкого спектру дії, патогенетичне та симптоматичне лікування), що супроводжувалась розвитком рестриктивної дихальної недостатності, застосовували фосфоліпіди у ліпосомальній формі. Препарат застосовували інгаляційно згідно інструкції - у дозі 10-15 мг/кг маси тіла на одну інгаляцію двічі на добу протягом всього курсу лікування (2 тижні). В ході експерименту в динаміці (на 5, 10, 12-14 дні лікування та через місяць після завершення терапії) досліджували об'ємно-часові показники зовнішнього дихання і газового обміну організму за допомогою спірометра SPIROLAB III Верс.3.1 SN307178 (Італія) та за допомогою газового аналізатора з гемоксиметрією - приладу Radelkis OP15 (Угорщина). При оцінці ефективності лікування основну увагу приділяли таким показникам як частота дихання, дихальний об'єм, хвилинний об'єм дихання, відношення альвеолярної вентиляції до хвилинного об'єму дихання, альвеолярна вентиляція, споживання кисню, виділення вуглекислого газу, мертвий дихальний простір, хвилинний об'єм кровотоку, напруження кисню в артеріальній крові, насичення артеріальної крові киснем, альвеоло-артеріальна різниця за киснем, напруження кисню у венозній крові та насичення венозної крові киснем. Перш за все, звертало на себе увагу зростання вентиляції легенів, про що свідчить збільшення частоти дихання та дихального об'єму. Частота дихання для контрольної групи складала $10,5 \pm 0,7$ хв.⁻¹, для дослідної групи - $16,8 \pm 1,3$ хв.⁻¹, (відмінності були достовірними відносно контролю). При лікуванні фосфоліпідами в ліпосомальній формі цей показник

складав на 5 день захворювання - $17,2 \pm 1,6$ л, на 10 день захворювання - $15,1 \pm 1,3$ л, на 12-14 день захворювання - $12,2 \pm 1,0$ л, через 1 місяць після лікування - $11,6 \pm 1,4$ л, що свідчить про тенденцію до нормалізації частоти дихання на фоні лікування. Щодо дихального об'єму, то для контрольної групи цей показник дорівнював $0,540 \pm 0,064$ л, для дослідної групи - $0,736 \pm 0,062$ л. На фоні лікування фосфоліпідами цей показник складав $0,698 \pm 0,058$ л, $0,664 \pm 0,048$ л, $0,601 \pm 0,048$ л, $0,565 \pm 0,07$ л на 5, 10, 12-14 дні лікування та через 1 місяць після лікування відповідно. Однак зростання вентиляторної функції легенів, що проявлялося гіпервентиляцією та задишкою, було недостатньо ефективним в плані забезпечення організму киснем. Показано, що один із основних показників ефективності дихання — співвідношення альвеолярної вентиляції і хвилинного об'єму дихання — був нижчим величини, характерної для контрольної групи, та коливався в межах 60,3–72,7 % (при контрольній величині 72,2–77,4 %). Споживання кисню — основний показник забезпечення організму киснем — збільшилось на 5-й день захворювання (приблизно на 76 % — з $(0,218 \pm 0,019$ л*хв.-1) до $(0,384 \pm 0,047$ л*хв.-1)), що свідчить про виражене збільшення рівня окислювального метаболізму в організмі при даному патологічному процесі. В подальшому можна було спостерігати деяку нормалізацію інтенсивності метаболічних процесів, але і через місяць від початку лікування захворювання рівень споживання кисню, залишаючись зниженим у порівнянні із контрольними значеннями, в середньому усього на 18 %, складав $(0,258 \pm 0,05$ л*хв.-1). Ці результати дозволяють зробити висновок про нормалізуючий вплив фосфоліпідів на рівень енергетичного метаболізму за рахунок саме оптимізації постачання організму киснем. Одночасно зі збільшенням споживання кисню збільшувалося і виділення вуглекислого газу. Цей показник майже в 2,3 рази перевищував контрольні значення на 5 день захворювання (складав $0,181 \pm 0,017$ л*хв.-1 та $0,415 \pm 0,022$ л*хв.-1 відповідно). Збільшення виділення вуглекислого газу стимулює діяльність дихального центру, спричиняючи гіпервентиляцію. Це сприяє розвитку метаболічного ацидозу, що в свою чергу призводить до респіраторного алкалозу. На тлі лікування фосфатидилхоліновими ліпосомами цей показник поступово знижувався та мав тенденцію наближення до контрольних значень через місяць після лікування ($0,216 \pm 0,042$ л*хв.-1). Ще один із досліджуваних показників – це мертвий дихальний простір. З альвеол цих ділянок кисень не йде в кров і в альвеоли з цих ділянок не надходить вуглекислий газ з крові, тобто не відбувається газообмін. Для контрольної групи значення показника становили $0,156 \pm 0,014$ л, для дослідної $0,229 \pm 0,018$ л, збільшуючись більше ніж на 46% (на фоні лікування: 5-й день – $0,288 \pm 0,013$ л, 10-й день – $0,218 \pm 0,017$ л, 12-14 день – $0,203 \pm 0,021$ л, через 1 місяць після лікування – $0,187 \pm 0,027$ л). Тобто за цим показником ефективність зовнішнього дихання також підвищувалася. Для контрольної групи показник хвилинного об'єму крові складав $6,5 \pm 0,7$ л. При захворюванні він знижувався до $4,7 \pm 0,8$ л (при лікуванні: на 5-й день захворювання він дорівнював $4,2 \pm 0,7$ л, на 10-й день – почав поступово нормалізуватись та складав $4,9 \pm 0,8$ л, на 12-14 день – $5,6 \pm 0,9$ л, через місяць після початку лікування – $5,9 \pm 0,6$ л). При аналізі напруження кисню в артеріальній та венозній крові, а також насиченням киснем артеріальної та венозної крові простежується поступова нормалізація показників на фоні застосування фосфатидилхолінових ліпосом. При цьому визначене споживання кисню зростає за рахунок гіпервентиляції, а не економічності та ефективності дихання. При

визначенні альвеоло-артеріальної різниці за киснем відзначалось підвищення цього показника у дослідної групи до $36,3 \pm 1,9$ мм рт ст (на фоні лікування фосфоліпідами на 5 день захворювання – $39,2 \pm 1,4$; на 10 день – $37,4 \pm 1,6$; на 12-14 день – $32,2 \pm 1,7$; через місяць після лікування – $32,5 \pm 2,3$ мм рт ст) у порівнянні з контрольною групою – $31,6 \pm 3,5$ мм рт ст. Серед причин формування альвеоло-артеріального градієнту кисню можна виділити наступні: зниження дифузії кисню через аерогематичний бар'єр, шунт венозної крові з малого кола кровообігу у великий, дисбаланс вентиляції відносно перфузії та збільшення альвеолярного «мертвого» простору. На основі отриманих даних показано, що більшість з досліджених нами показників робили внесок у зниження альвеоло-артеріальної різниці за киснем, отже у підвищення ефективності зовнішнього дихання. Введення препарату позитивно впливало на функцію зовнішнього дихання вже з 5 дня лікування пневмонії: хоча явища гіпервентиляції і зберігалися, але здійснення газообмінної функції легенів ставало більш ефективним. За результатами роботи встановлені основні підходи до використання засобів корекції легеневого фіброзу. Експериментально обґрунтовано доцільність апробації в клінічній практиці фосфоліпідів у ліпосомальній формі та активатору АТФ-залежного K^+ -каналу для лікування пневмоній, особливо, що набувають ознак хронізації. Це сприятиме підвищенню ефективності лікувального процесу, зменшенню невиправданих витрат та ризиків для пацієнтів, зниженню смертності та інвалідизації, збільшенню очікуваної тривалості життя населення України.

Ключові слова

експериментальна пневмонія, хронічна пневмонія, пневмосклероз, аерогематичний бар'єр, мітохондрії, ультраструктура, морфофункціональний стан, зовнішнє дихання, легені, АТФ-залежний K^+ канал, уридин, фосфоліпіди, дихальна недостатність