

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕГКИХ ПРИ ИНГАЛЯЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И ПЕРФТОРАНА

А. М. Голубев¹, А. Н. Кузовлев¹, Д. В. Сундуков², М. А. Голубев²

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва, Россия
107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Morphological Characteristics of the Lung during Lipopolysaccharide and Perfluorane Inhalation

A. M. Golubev¹, A. N. Kuzovlev¹, D. V. Sundukov², M. A. Golubev²

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow, Russia
25, Petrovka, Build. 2, Moscow 107031

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia
6, Miklukho-Maklai St., Moscow 117198

Использование перфторана с целью цитопroteкции структур легких при грамотрицательных инфекциях легких изучено недостаточно. *Цель исследования* — выявить в эксперименте характер морфологических изменений в легких при сочетанном ингаляционном воздействии липополисахарида (ЛПС) и перфторана, обладающего цитопroteкторными свойствами. *Материалы и методы*. Эксперимент был выполнен на 48 белых беспородных крысах-самцах массой 320–350 г. Экспериментальные животные были распределены группы: группа 1 (Гр. 1, $n=12$) — контрольная (ИВЛ 1 ч.); группа 2 (Гр. 2, $n=12$) — ингаляционное введение ЛПС 1,0 мг; группа 3 (Гр. 3, $n=12$) — ингаляционное введение перфторана 1,0 мл; группа 4 (Гр. 4, $n=12$) — ингаляционное введение ЛПС 1,0 мг, затем ингаляционное введение перфторана 1,0 мл. *Результаты*. По данным морфологического исследования в Гр. 1 (контроль) не было выявлено признаков повреждения структур легких. В Гр. 2 (ЛПС) были отмечены признаки ЛПС-индуцированного повреждения легких. В Гр. 3 (перфторан) спустя 3 ч. после ингаляционного введения перфторана в просвете бронхов обнаруживаются комплексы макрофагов с вакуолизированной цитоплазмой (перфторофаги). В Гр. 4 ингаляционное введение перфторана оказывает цитопroteкторный эффект: степень выраженности морфологических изменений в легких, вызванных ЛПС, была значительно меньше после ингаляции перфторана по сравнению с Гр. 2. *Выводы*. В экспериментальной модели ЛПС-индуцированного повреждения легких показано, что ингаляция ЛПС приводит к повреждению альвеолярного и бронхиального эпителия, развитию интерстициального и альвеолярного отека, выраженной клеточной инфильтрации за счет лимфоцитов, сегментоядерных лейкоцитов и макрофагов. В данной модели показано, что ингаляционное введение перфторана минимизирует повреждение альвеолярного и бронхиального эпителия, уменьшает выраженность интерстициального и альвеолярного отека. Это подтверждает данные клинических исследований и открывает возможности для использования ингаляции перфторана в реаниматологии.

The use of perfluorane for the cytoprotection of lung structures in gram-negative lung infections has been inadequately studied. *Objective*: to experimentally reveal the pattern of morphological changes in the lung during combined inhalation of lipopolysaccharide (LPS) and perfluorane that has cytoprotective properties. *Materials and methods*. The experiment was carried out on 35 outbred male albino rats weighing 320–350 g. The experimental animals were allocated to groups: 1) one-hour ventilation (controls) ($n=5$); 2) inhaled LPS 1.0 mg ($n=5$); 3) inhaled perfluorane 1.0 ml ($n=10$); 4) inhaled LPS 1.0 mg and then inhaled perfluorane 1.0 ml ($n=10$). *Results*. According to morphological findings, Group 1 (controls) was found to have no signs of lung structural changes. Group 2 (inhaled LPS) was noted to have signs of characteristic LPS-induced lung injury. Group 3 (inhaled perfluorane) showed complexes of macrophages with vacuolated cytoplasm (perfluorophages) in the bronchial lumen 3 hours after inhaled perfluorane administration. In Group 4, inhaled perfluorane exerted a cytoprotective effect: the degree of LPS-induced morphological changes in the lung was much lower than that in Group 2. *Conclusion*. The experimental model of LPS-induced lung injury indicated that LPS inhalation led to alveolar and bronchial epithelial damage, interstitial and alveolar edema, and obvious cell infiltration at the expense of lymphocytes, segmented leukocytes,

Адрес для корреспонденции:

Кузовлев Артем Николаевич
E-mail: artem_kuzovlev@mail.ru

Correspondence to:

Kuzovlev Artem Nikolaevich
E-mail: artem_kuzovlev@mail.ru

and macrophages. This model showed that inhaled perfluorane reduced the signs of alveolar and bronchial epithelial damage and the degree of interstitial and alveolar edema. This supports clinical findings and offers possibilities of using inhaled perfluorane in resuscitation. **Key words:** critical conditions, lipopolysaccharide-induced lung injuries, perfluorane, cytoprotection.

DOI:10.15360/1813-9779-2015-1-6-13

Введение

Критические состояния осложняются инфекциями легких у 25–30% больных. Ассоциации грамотрицательных микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumonia*) являются ведущими при нозокомиальных инфекциях легких. По данным нашего исследования [1–2], у 70–80% больных в посевах бронхоальвеолярной лаважной жидкости выявляется *Pseudomonas aeruginosa*, у 70–90% — *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, у 30–40% — *Klebsiella pneumonia*. Ведущее звено патогенеза грамотрицательных инфекций — липополисахарид (ЛПС). Летальность при грамотрицательных инфекциях легких достигает 70% [3]. Острый респираторный дистресс-синдром осложняется нозокомиальной пневмонией у 34–60% больных, а тяжелые нозокомиальные пневмонии в 12–33% — острым респираторным дистресс-синдромом, что увеличивает летальность до 80% [4].

Перфторан обладает доказанными цитопротекторными эффектами [5, 6]. В то же время, использование перфторана с целью цитопротекции легких при грамотрицательных инфекциях легких и их осложнениях изучено недостаточно.

Цель исследования — выявить в эксперименте характер морфологических изменений в легких при сочетанном ингаляционном воздействии ЛПС и перфторана, обладающего цитопротекторными свойствами.

Материал и методы

Протокол экспериментального исследования был одобрен Локальным Этическим комитетом НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского. Эксперимент был выполнен на 48 белых беспородных крысах-самцах массой 320–350 г. (вес животных не различался между группами). Общую анестезию проводили хлоралгидратом (15–20 мг/кг, внутривенно, однократно). Далее выполняли интубацию трахеи трубкой 2,5 мм диаметром и осуществляли искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) аппаратом «TSE Animal Respirator Process Control O2-25» (Technical Scientific Equipment, Германия). ИВЛ проводили в контролируемом по объему режиме: дыхательный объем 2 мл (6 мл/кг массы животного), частота дыханий 40 в минуту. Пиковое давление в дыхательных путях составляло при этом 13–15 см водн. ст.

Экспериментальные животные были распределены на следующие группы:

- группа 1 (Гр. 1, $n=12$) — контрольная (наркоз, ИВЛ в течение 1 ч., пробуждение животных, экстубация и транспортировка в виварий). Выведение животных данной группы из эксперимента осуществлялось путем декапитации под наркозом через 3 ч. ($n=6$) и 24 ч. ($n=6$);
- группа 2 (Гр. 2, $n=12$) — наркоз, ИВЛ, ингаляционное введение ЛПС в дозе 1,0 мг в течение 15 мин., далее ИВЛ в течение 1 ч., пробуждение животных, экстубация и транспортировка в виварий. Выведение животных данной группы

Introduction

Critical states are complicated by pulmonary infections in 25–30% of patients. Associations of critical illness with gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumonia*) are leading in nosocomial pulmonary infections. According to our studies [1–2], in bronchoalveolar lavage fluid *Pseudomonas aeruginosa* is detected in 70–80%, *Acinetobacter baumannii* / *calcoaceticus* in 70–90%, *Klebsiella pneumonia* — in 30–40% of patients. The leading link in the pathogenesis of gram-negative infections is lipopolysaccharide (LPS). The mortality in gram-negative pulmonary infections is close to 70% [3]. Acute respiratory distress syndrome is complicated by nosocomial pneumonia in 34–60% of patients, and severe nosocomial pneumonia is complicated by the acute respiratory distress syndrome in 12–33% of patients that increases the mortality up to 80% [4].

Perfluorane derivative, the Perftoran, has proved cytoprotective effects [5, 6]. However, cytoprotection of lung tissues in gram-negative pneumonia and its complications has been poorly studied.

The aim of the study was to investigate the morphological alterations in lungs following inhaled administration of LPS and perftoran in a rat model of LPS-induced damage.

Materials and Methods

The experimental protocol was approved by the Local ethical committee of the V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology. The experiment was done on 48 outbred male rats, weight 320–350 g (no differences in weight between the groups). General anesthesia was induced by chloralhydrate 15–20 mg/kg intraperitoneally as a single bolus. The trachea was intubated with a 2.5 mm tube and mechanical ventilation (MV) started («TSE Animal Respirator Process Control O2-25», Technical Scientific Equipment, Germany). Ventilation was volume-controlled with a 2 ml tidal volume (6 ml/kg per body weight), respiratory rate 40/min, peak airway pressure — 13–15 water cm.

Experimental animals were split into 4 groups:

- group 1 ($n=12$) — controls (narcosis, MV for 1 h, awakening, extubation, transportation to the animal facility). Animals were executed by decapitation 3 ($n=6$) and 24 hrs. ($n=6$) after that.
- group 2 ($n=12$) — narcosis, MV, inhaled LPS 1.0 mg within 15 mins, then MV for 1 h, awakening, extubation, transportation to the animal facility. Animals were executed by decapitation 3 ($n=6$) and 24 hrs. ($n=6$) after that.
- group 3 ($n=12$) — narcosis, MV, inhaled perftoran 1.0 ml within 15 mins, then MV for 1 h, awakening, extubation, transportation to the animal facility. Animals were executed by decapitation 3 ($n=6$) and 24 hrs. ($n=6$) after that.
- group 4 ($n=12$) — narcosis, MV, inhaled LPS 1.0 mg within 15 mins, then inhaled perftoran 1.0 ml within 15 mins, then MV for 1 h, awakening, extubation, transportation to vivarium. Animals were executed by decapitation 3 ($n=6$) and 24 hrs. ($n=6$) after that.

Escherichia coli LPS was used in this experiment (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and perftoran (company «Perftoran», Russia). Perftoran and LPS were administered via the

Mechanisms of the development of critical illness

из эксперимента осуществлялось путем декапитации под наркозом через 3 ч. ($n=6$) и 24 ч. ($n=6$);

- группа 3 (Гр. 3, $n=12$) — наркоз, ИВЛ, ингаляционное введение перфторана в дозе 1,0 мл в течение 15 мин., далее ИВЛ в течение 1 ч., пробуждение животных, экстубация и транспортировка в виварий. Выведение животных данной группы из эксперимента осуществлялось путем декапитации под наркозом через 3 ч. ($n=6$) и 24 ч. ($n=6$);

- группа 4 (Гр. 4, $n=12$) — наркоз, ИВЛ, ингаляционное введение ЛПС в дозе 1,0 мг в течение 15 мин. и затем перфторана в дозе 1,0 мл в течение 15 мин., далее ИВЛ в течение 1 ч., пробуждение животных, экстубация и транспортировка в виварий. Выведение животных данной группы из эксперимента осуществлялось путем декапитации под наркозом через 3 ч. ($n=6$) и 24 ч. ($n=6$).

В исследовании использовал ЛПС *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Германия) и перфторан (НПФ «Перфторан»). Введение ЛПС и перфторана проводили при помощи небулайзера «Aeroneb Pro» (Aeroneb, Ирландия) в соответствии с инструкциями производителя. Небулайзер размещали в инспираторном шланге дыхательного контура, на расстоянии 10 см от эндотрахеальной трубки.

После декапитации у всех крыс проводился забор легких для гистологического исследования. Кусочки легких фиксировали в нейтральном 10% растворе формалина, заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для анализа морфологических изменений использовали микроскоп OLYMPUS BX41 и программу анализа изображения IMAGE SCOPE.

Морфологические изменения в легких (интерстициальный отек, кровоизлияния (периваскулярных и альвеолярных), ателектазы и дистелектазы, нарушения микроциркуляции (стазы и агрегация эритроцитов), слушивание бронхиального и альвеолярного эпителия, степень выраженности клеточной реакции, наличие перфторофогов) оценивали непараметрическими методами (критерий χ^2). Различия считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

По данным морфологического исследования в Гр. 1 (контроль) не было выявлено признаков повреждения структур легких. Просветы альвеол и бронхов свободны, не обнаружено признаков повреждения бронхиального и альвеолярного эпителия. Расстройства кровообращения, интерстициальный и альвеолярный отек, ателектазы и дистелектазы отсутствовали. Морфологические изменения в легких в данной группе достоверно отличались от изменений в остальных группах ($p=0,0001$). Таким образом, в данной серии экспериментов патологических изменений в легких выявлено не было.

В Гр. 2 (ингаляционное введение ЛПС) были отмечены признаки ЛПС-индуцированного повреждения легких через 3 ч. и 24 ч. после ингаляции ЛПС. Через 3 ч. после ингаляции ЛПС отмечается периаптериальный и перивенулярный отек, периваскулярные и альвеолярные кровоизлияния (рис. 1), расширение лимфатических сосудов. Многие альвеолы расправлены, в то же время обнаруживаются очаговые дистелектазы. В просвете альвеол встречаются клетки слущенного альвеолярного эпителия и макрофаги. Альвеолярные ходы расширены. В просветах бронхов обнаруживаются сегментоядерные лейкоциты, лимфоциты, в небольшом

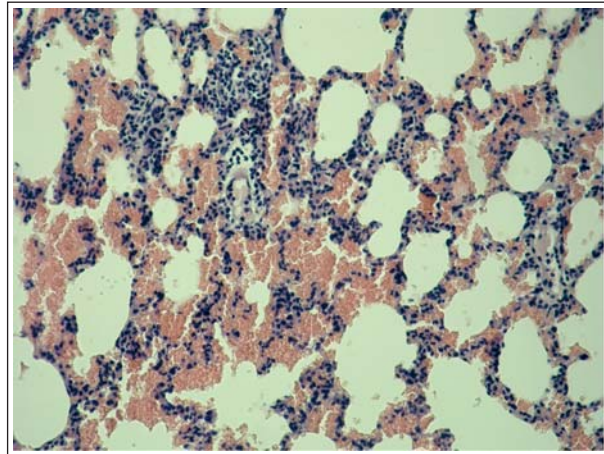


Рис. 1. Альвеолярные кровоизлияния через 3 ч. после ингаляции липополисахарида. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

Fig. 1. Alveolar hemorrhages three hrs after lypopolysaccharide inhalation. Hematoxyline and eosine. $\times 200$.

«Aeroneb Pro» nebulizer (Aeroneb, Ireland) according to the manufacturer's instructions. Nebulizer was put into the inspiratory limb of the circuit at a 10-cm distance from the endotracheal tube.

Lung tissue specimens for histological examination were withdrawn after the decapitation of animals, fixed in neutral 10% formalin and embedded into paraffin. Histological slices were stained by hematoxyline and eosine. OLYMPUS BX41 microscope and IMAGE SCOPE software were used for morphometry.

Morphological alterations in the lungs (interstitial edema, perivascular and alveolar hemorrhages, atelectases and dystelectases, microcirculatory disturbances (red blood cells stasis and aggregation), desquamation of bronchial and alveolar epithelium, cellular response, macrophages harvested the perftoran nanoparticles — perfluorophages) were assessed by nonparametric method (χ^2 criterion). Differences were considered statistically significant when $p<0,05$.

Results and Discussion

There were no signs of pulmonary damage in group 1 (controls). The lumen of alveoli and bronchi was free, there were no signs of alveolar or bronchial epithelium damage, no circulatory disturbances, interstitial or pulmonary edema, atelectases or dystelectases. Morphological alterations on this group significantly differed from the other groups ($p=0,0001$). Therefore there were no pathological changes in these groups of animals.

In group 2 (inhaled LPS) signs of LPS-induced lung injury in 3 and 24 hours after LPS inhalation became evident. Three hours after LPS inhalation periaapterial and perivenular edema, perivascular hemorrhages, dilated lymphatic vessels were detected (Fig. 1). Many alveoli were free, but some dystelectases were seen. Desquamated alveolar epithelium and macrophages were seen in some alveoli. Alveolar ducts were dilated. Neutrophils, lymphocytes and some macrophages, desquamated epithelial cells, apoptotic bodies were accumulated in bronchial lumen. Inter-alveolar septi were infiltrated by lymphocytes, neutrophils and macrophages. Lymphocytes, neutrophils and macrophages were also detected in peribronchial and perivascular connective tissue.

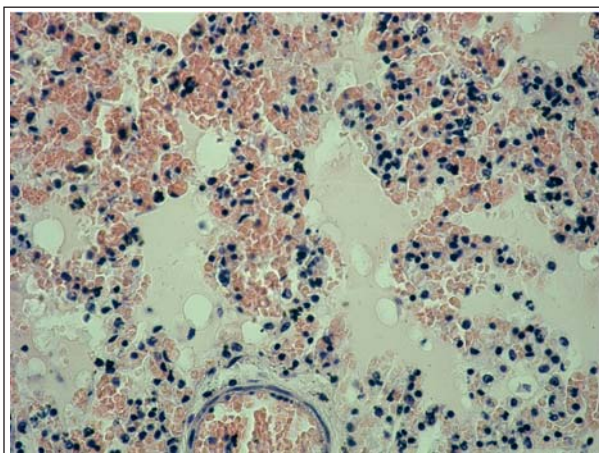


Рис. 2. Альвеолярный отек, полнокровие капилляров, альвеолярные кровоизлияния через 24 ч. после ингаляции липополисахарида. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.
Fig. 2. Alveolar edema, capillary plethra, alveolar hemorrhages 24 hours after lipopolysaccharide inhalation. Hematoxyline and eosine. $\times 400$.

количестве макрофаги, слущенные эпителиальные клетки, апоптотические тельца. Межальвеолярные перегородки инфильтрированы лимфоцитами, небольшим количеством сегментоядерных лейкоцитов и макрофагов. В перибронхиальной и периваскулярной соединительной ткани также выявляются лимфоциты, сегментоядерные лейкоциты и макрофаги.

Через 24 ч. после ингаляции ЛПС (рис. 2) обнаруживается альвеолярный отек. Нарастает инфильтрация межальвеолярных перегородок сегментоядерными лейкоцитами, что приводит к утолщению межальвеолярных перегородок и уменьшению просвета альвеол. Обнаруживаются очаговые ателектазы и дистелектазы. В просвете бронхов отмечаются скопления сегментоядерных лейкоцитов и небольшого количества макрофагов.

В Гр. 3 (ингаляционное ведение перфторана) спустя 3 ч. после ингаляционного введения перфторана в просвете бронхов обнаруживаются комплексы макрофагов с вакуолизированной цитоплазмой (перфторофаги). В формировании таких комплексов принимает участие до 30 макрофагов. В альвеолах встречаются небольшие скопления и единичные перфторофаги (рис. 3). Альвеолы расправлены, некоторые межальвеолярные перегородки утолщены за счет инфильтрации лимфоцитами с примесью сегментоядерных лейкоцитов. Просветы бронхов и бронхиол свободны. Признаки повреждения бронхиального эпителия отсутствуют.

Через 24 ч. альвеолы расправлены, свободны, в просветах бронхиол обнаруживаются перфторофаги и небольшое количество сегментоядерных лейкоцитов. К фолликулярному эпителию прилежат скопления лимфоцитов, с небольшим числом перфторофагов и сегментоядерных лейкоцитов. Миграция клеток, по всей видимости, осуществляется между клетками фолликулярного эпителия и в области контакта фолликулярного и мерцательного эпителия. Отдельные межальвео-

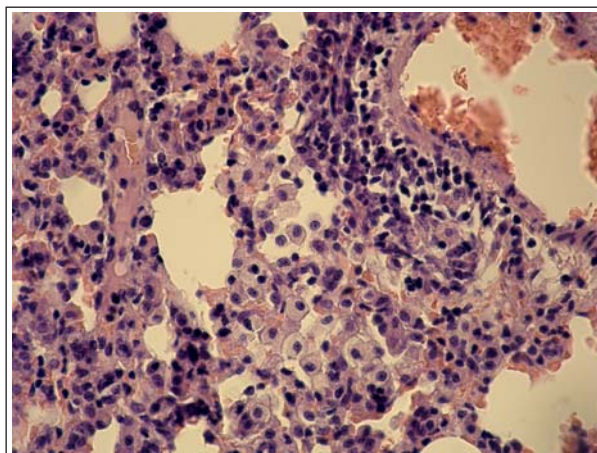


Рис. 3. Перфторофаги в просвете альвеол через 3 ч. после ингаляции перфторана. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

Fig. 3. Perfluorophages in alveolar lumen three hours after perfltoran inhalation. Hematoxyline and eosine. $\times 400$.

Twenty four hours after the LPS inhalation (Fig. 2) the alveolar edema was detected, infiltration of interalveolar septi by neutrophils and thickening of them with a decrease of alveolar lumen were seen. Focal atelectases and dystelectases were observed, as well as accumulation of neutrophils and some macrophages in the bronchial lumen.

In group 3 (inhaled perfltoran), three hours after inhalation of perfltoran macrophages with vacuolized cytoplasm (perfluorophages) were detected. These complexes were comprised of up to 30 macrophages (Fig. 3). Alevoli were dilated, some interalveolar septi were thickened due to cellular infiltration with lymphocytes and neutrophils. Brochial and bronchiolar lumens remained free. No signs of bronchial epithelium damage were observed.

After 24 hours after the end of experiment the alveoli remained free, dilated, perfluorophages and some neutrophils were detected in bronchiolar lumens. Complexes of lymphocytes with some perfluorophages were adjacent to follicular epithelium. Migrating cells apparently accumulated between the cells of the follicular epithelium and within the contact area of follicular and ciliated epithelium. Separate interalveolar septi were thickened due to cellular infiltration.

Morphological changes in the lungs in group 3 (evaluated at 3 and 24 hours after the administration of perfltoran) differed significantly from changes in group 2 (inhalational administration of LPS), i.e. there was a lower incidence of interstitial edema, hemorrhage (perivascular and alveolar), atelectases and dystelectases, less pronounced microcirculation disturbances (stasis and aggregation of red blood cells), and the severity of bronchial and alveolar epithelium desquamation ($p=0,0001$). There were no significant differences between the groups in the severity of cell reaction. In group 3 perfluorophages were observed in bronchi and alveoli ($p=0,0001$).

In a Group 4 (combined inhalational administration of LPS and perfltoran), in three hours after the end of experiment alveoli were mostly free and dilated. In

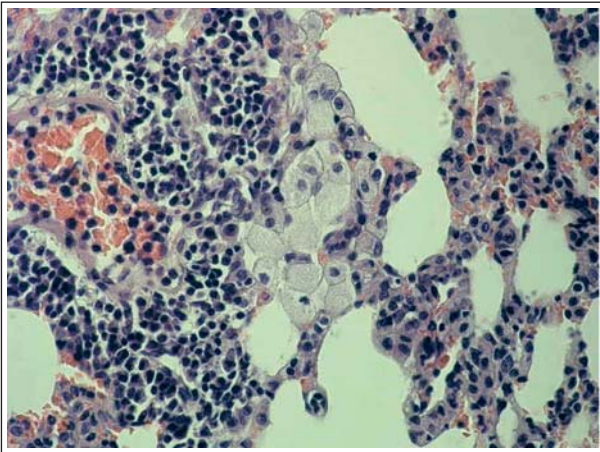


Рис. 4. Перфторофаги через 3 ч. после ингаляции липополисахарида и перфторана. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

Fig. 4. The perfluorophages three hours after lypopolysaccharide and perftoran inhalation. Hematoxyline and eosine. $\times 400$.

лярные перегородки утолщены за счет увеличения содержания лимфоидных клеток и в меньшем количестве сегментоядерных лейкоцитов.

Морфологические изменения в легких в группе 3 (оценены через 3 и 24 ч. после введения Перфторана) достоверно отличались от изменений в группе 2 (ингаляционное введение ЛПС): была меньшей частота выявления интерстициального отека, кровоизлияний (периваскулярных и альвеолярных), ателектазов и дистелектазов, были менее выражены нарушения микроциркуляции (стазы и агрегация эритроцитов) и степень выраженности слипания бронхиального и альвеолярного эпителия ($p=0,0001$). Не было выявлено достоверных различий между группами по степени выраженности клеточной реакции. В группе 3 закономерно были выявлены перфторофаги в просветах бронхов и альвеол ($p=0,0001$).

В Гр. 4 (сочетанное ингаляционное введение ЛПС и перфторана) через 3 ч. от начала эксперимента альвеолы в большинстве своем расправлены, воздушны. В части альвеол обнаруживаются макрофаги с вакуолизированной цитоплазмой, которые располагаются одиночно или небольшими группами (рис. 4). В межальвеолярных перегородках выявляются сегментоядерные лейкоциты, лимфоциты, макрофаги. Выявляются очаговые дистелектазы. Просветы крупных бронхов и бронхиол свободны, в некоторых из них в небольшом количестве содержатся сегментоядерные лейкоциты и единичные макрофаги. В венулах отмечается краевое расположение сегментоядерных лейкоцитов. Выявляется периартериальный отек, в отечной жидкости скопления сегментоядерных лейкоцитов.

Через 24 ч. в просвете крупных бронхов выявляются скопления сегментоядерных лейкоцитов и крупных макрофагов с мелковакуолизированной цитоплазмой (перфторофаги). Многие межальвеолярные перегородки утолщены за счет повышенного содержания клеток (рис. 5). В слизистой оболочке бронхов много бокаловидных клеток. В просветах альвеол еди-

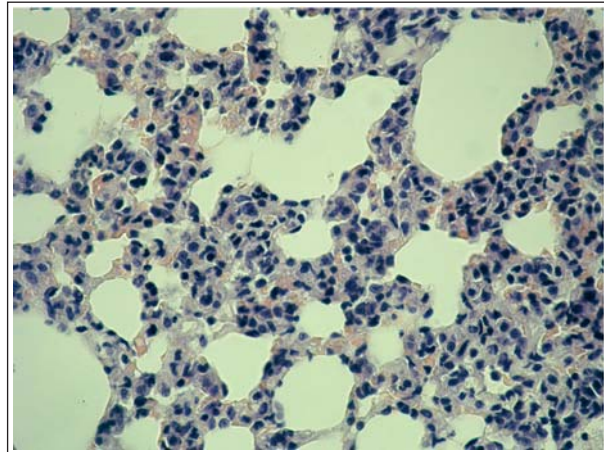


Рис. 5. Утолщение межальвеолярных перегородок, клеточная реакция через 24 ч. после ингаляции липополисахарида и перфторана. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

Fig. 5. Thickening of interalveolar septi, cellular response 24 hours after lypopolysaccharide and perftoran inhalation. Hematoxyline and eosine. $\times 400$.

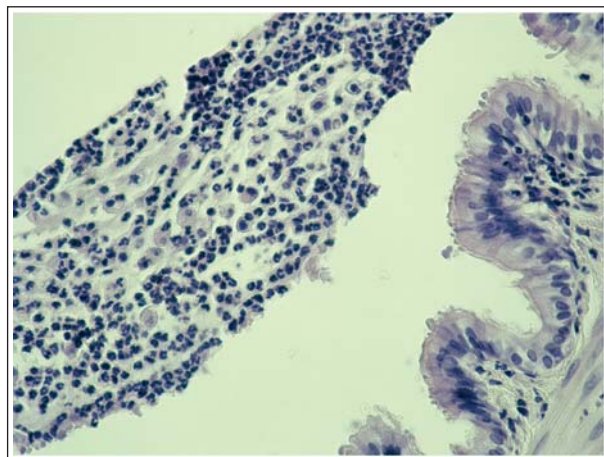


Рис. 6. Перфторофаги и сегментоядерные лейкоциты в просвете бронха через 24 ч. после ингаляции липополисахарида и перфторана. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

Fig. 6. Perfluorophages and neutrophils in bronchial lumen 24 hours. after lypopolysaccharide and perftoran inhalation. Hematoxyline and eosine. $\times 400$.

some alveolar macrophages the cytoplasm was vacuolized, the vacuoles were separate or organized in groups (Fig. 4). In the interalveolar septi the accumulations of neutrophils, lymphocytes and macrophages were detected. Lumens of the large bronchi and bronchioli were free, some of them contained a small amount of neutrophils and macrophages. In venules a marked boundary location of neutrophils was seen. Periarterially edema and neutrophils was detected.

24 hours after the end of experiment complexes of neutrophils and large macrophages with small-vacuolized cytoplasm (perfluorophages) were detected in large bronchi. Inter-alveolar septi were thickened due to cellular infiltration (Fig. 5). Many goblet cells were seen in bronchial mucus layer. Separate perfluorophages were seen in alveolar lumens (Fig. 6). Edematous fluid with lymphocytes, macrophages and some neutrophils was detected in

ничные перфторофаги. В просветах бронхов обнаруживаются перфторофаги и сегментоядерные лейкоциты (рис. 6). В периартериальной соединительной ткани (единичные артерии) содержится отечная жидкость, в которой видны лимфоциты, макрофаги, в небольшом количестве сегментоядерные лейкоциты. Просветы бронхов и бронхиол свободны.

Морфологические изменения в легких в данной группе (через 24 ч. после введения перфторана) не отличались от изменений в группе 3 (ингаляционное введение перфторана) и достоверно отличались от изменений в группе 2 по указанным выше признакам (ингаляционное введение ЛПС) ($p=0,0001$).

Центральным звеном патогенеза грамотрицательных инфекций является действие фрагментов оболочки грамотрицательных бактерий, по химической структуре относящихся к липополисахаридам (ЛПС). Термин «эндотоксин» впервые появился в литературе в 1892 году по отношению к термостабильному компоненту лизата грамотрицательных бактерий [7]. Липополисахарид составляет около 75% наружной мембраны грамотрицательных бактерий и состоит из гидрофобного липида А и полисахаридного О-антигена. Липополисахарид в крови транспортируется в связи с ЛПС-связывающим протеином. Липидная часть ЛПС распознается клетками врожденного иммунитета посредством Toll-подобными рецепторами 4 типа, после чего происходит активация внутриклеточного ядерного фактора κB (NF κB) и синтез цитокинов (ИЛ-8, ИЛ-6, ИЛ-1, ИЛ-12, ИЛ-1 β , ФНО- α). Ингаляционное введение ЛПС сопровождается значительным усилением синтеза ФНО- α альвеолоцитами 2 типа. Кроме того, липид А ЛПС вызывает повреждение эндотелиоцитов посредством стимуляции выработки цитокинов и ростового фактора, которые приводят к апоптозу эндотелиоцитов. Во многих исследованиях показано, что экспериментальное ингаляционное введение ЛПС сопровождается развитием признаков острого респираторного дистресс-синдрома с выраженной клеточной реакцией на территории легких [7, 8]. Использование в эксперименте препарата силвестат (блокатор эластазы нейтрофилов) способствует уменьшению выраженности повреждения легких после ингаляции ЛПС [9].

Ингаляционное введение перфторана оказывает цитопротекторный эффект: степень выраженности морфологических изменений в легких, вызванных ЛПС, была значительно меньше после ингаляции перфторана по сравнению с Гр. 2 (ингаляция ЛПС без перфторана). Нам не удалось найти в доступной литературе аналогичных по дизайну и используемым веществам (перфторан) экспериментальных исследований. Было показано, что внутривенное введение перфторуглеродной эмульсии до ингаляции ЛПС обладает цитопротекторным действием на структуры легких [8], а ингаляция перфторуглерода способствует увеличению индекса оксигенации, статического комплайенса и дыхательного объема при повреждении легких, вызванном детергентом [10, 11]. Полученные нами экспериментальные дан-

periarterial connective tissue. Bronchial and bronchiolar lumens were free.

Morphological changes in this group did not differ from those in group 3, but were significantly different from those in a group 2 ($p=0,0001$).

The central part of the pathogenesis of gram-negative infections is the action of lipopolysaccharide (LPS) on the cells. The term «endotoxin» first appeared in the scientific literature in 1892 in relation to a thermostable negative bacteria lysate component [7]. Lipopolysaccharide composes about 75% of the outer membrane of gram-negative bacteria and consist of a hydrophobic lipid A and O-polysaccharide antigen. Lipopolysaccharide is transported in the blood in connection with the LPS-binding protein. The lipid part of the LPS is recognized by the innate immune cells, Toll-like receptor type 4 (TLR4), which mediate signaling process to activate the proinflammatory transcription factor NF κB , initiating the production of cascade of inflammatory cytokines (IL-8, IL-6, IL-1, IL-12, IL-1 β , TNF- α). Inhalational administration of LPS is accompanied by a significant increase in the synthesis of TNF- α by alveolocytes. Moreover, lipid A, the LPS component, causes endothelial damage by stimulating production of cytokines and growth factors, which leads to apoptosis of endothelial cells. Experimental inhalational administration of LPS is accompanied by the development of acute respiratory distress syndrome with a significant cellular reaction in lungs [7, 8]. Use of an experimental drug silvestat (blocker of the neutrophil elastase) reduces the severity of lung damage after LPS inhalation [9].

In present study, the inhalational administration of perftoran resulted in cytoprotective effects: the severity of morphological changes in the lungs caused by LPS was significantly lower after the inhalation of perftoran compared to animals received only LPS without perftoran (group 2). To our knowledge, this was the first morphological analysis of lungs following the inhalational use of perfluorocarbon derivative in experimental model of sepsis. Earlier papers reported the cytoprotective effects on lungs of the intravenous administration of perfluorocarbon emulsion [8], whereas the inhalation of perfluorocarbons increased the oxygenation index, static respiratory compliance and tidal volume in the lung injury caused by detergent [10, 11]. Our experimental data are in compliance with the results of several clinical studies that demonstrated the efficacy of endobronchial administration of perftoran in improving gas exchange parameters and the functional conditions of the lungs. Thus, the administration of the endobronchial perftoran was more effective in patients with acute respiratory distress syndrome caused by direct damaging factors. In this group the treatment increased the oxygenation index to 34.6% compared to 17.8% in control (no perftoran), whereas the decrease of pulmonary shunt fraction was 23.3% vs. 14.3% in control. The efficacy of perftoran is presumably results from its cytoprotective effects and improvements of lung biomechanics. Definitely the less pronounced effect of endobronchial perftoran in acute respiratory distress syndrome caused by indirect

ные подтверждаются результатами ряда клинических исследований, в которых была показана эффективность эндобронхиального перфторана в отношении улучшения показателей газообмена и функционального состояния легких. В клиническом исследовании было впервые показано, что эндобронхиальное введение перфторана более эффективно у больных ОРДС, вызванным прямыми повреждающими факторами: в данной группе прирост индекса оксигенации составил 34,6% (против 17,8%), снижение фракции внутрилегочного шунтирования 23,3% (против 14,3%). Эффективность перфторана при эндобронхиальном введении связана, вероятно, с его цитопротективными эффектами и улучшение легочной биомеханики. Очевидно, что меньшая клиническая эффективность эндобронхиального перфторана при ОРДС, вызванном непрямыми повреждающими факторами, связана с плохим его проникновением в поврежденные зоны легких [5, 12].

Механизмы цитопротекторного действия перфторуглеродов на структуры легких остаются дискуссионными. Известно, что перфторуглероды ингибируют синтез ФНО- α в нейтрофилах [13], моноцитах [14] и альвеолярных макрофагах [15–17], снижают экспрессию межклеточной молекулы адгезии 1 типа на эндотелиоцитах, что угнетает миграцию нейтрофилов [18]. Также предполагают, что перфторуглероды могут формировать барьер вокруг клеток иммунной системы, препятствующий межклеточным взаимодействиям [19–20]. Необходимо отметить, что вышеперечисленные исследования были выполнены с использованием перфторуглеродных эмульсий, отличных по составу от перфторана.

Выводы

Таким образом, в экспериментальной модели ЛПС-индуцированного повреждения легких показано, что ингаляция ЛПС приводит к повреждению альвеолярного и бронхиального эпителия, развитию интерстициального и альвеолярного отека, выраженной

damaging factors was associated with its poor penetration into lung areas [5, 12].

Cytoprotective mechanisms of action of perfluorocarbons on lung structure remain debatable. It is known that perfluorocarbons inhibit the synthesis of TNF- α in neutrophils [13], monocytes [14] and alveolar macrophages [15–17], reduce the expression of the intercellular adhesion molecule type 1 (ICAM-1) on endothelial cells, which inhibits the migration of neutrophils [18]. It is also suggested that perfluorocarbons may form a barrier around the cells of the immune system preventing cell-cell interactions [19–20]. It should be noted that the abovementioned studies were performed using perfluorocarbon emulsions differing in composition from perftoran.

Conclusion

This experimental model of LPS-induces lung injury confirmed that LPS causes damage of alveolar and bronchial epithelium, results in development of interstitial and alveolar edema, induces extensive cellular response through accumulating the lymphocytes, neutrophils and macrophages within the lung tissue. This study demonstrates that inhaled perftoran decreases pulmonary alveolar and bronchial epithelium damage and decreases the degree of pulmonary edema. This data confirm clinical investigations of perftoran and provide the way to a broader implementation of inhaled perftoran in intensive care medicine.

клеточной инфильтрации за счет лимфоцитов, сегментоядерных лейкоцитов и макрофагов. В данной модели показано, что ингаляционное введение перфторана минимизирует повреждение альвеолярного и бронхиального эпителия, уменьшает выраженность интерстициального и альвеолярного отека. Это подтверждает данные клинических исследований и открывает возможности для ингаляционного применения перфторана в реаниматологии.

Литература

1. Мороз В.В., Голубев А.М., Кузовлев А.Н., Писарев В.М., Шабанов А.К., Голубев М.А. Сурфактантный белок D – биомаркер острого респираторного дистресс-синдрома. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (4): 11–17. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-4-11>
2. Хубутия М.Ш., Шабанов А.К., Булава Г.В., Дорфман А.Г., Зайнутдинов З.М., Скулачев М.В., Кузовлев А.Н., Гребенчиков О.А., Сергеев А.А., Шпитонков М.И., Мальцев Г.Ю. Окислительный дистресс у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология*. 2014; 10 (2): 23–30. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-2-23-30>
3. Яковлев А.Ю., Гуцина Н.Н., Ниязатов А.А., Зайцев Р.М., Голубцова Е.Ю., Рябикова М.А. Ранняя оценка эффективности антибактериальной терапии нозокомиальной пневмонии путем количественного определения липополисахарида. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (6): 45–52. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-6-45>
4. Мороз В.В., Голубев А.М., Марченков Ю.В., Власенко А.В., Кузовлев А.Н. Диагностика острого респираторного дистресс-синдрома при нозокомиальной пневмонии. Методические рекомендации. М.: НИИОР РАМН; 2011.
5. Кузовлев А.Н., Мороз В.В., Голубев А.М., Половников С.Г. Ингаляционные антибиотики в лечении тяжелой нозокомиальной пневмонии. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (6): 61–70. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-6-61>

References

1. Moroz V.V., Golubev A.M., Kuzovlev A.N., Pisarev V.M., Shabanov A.K., Golubev M.A. Surfactant protein D – biomarker of acute respiratory distress syndrome. *General Reanimatology*. 2013; 9 (4): 11–17. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-4-11>. [In Russ.]
2. Khubutiya M.Sh., Shabanov A.K., Bulava G.V., Dorfman A.G., Zainutdinov Z.M., Skulachev M.V., Kuzovlev A.N., Grebenchikov O.A., Sergeyev A.A., Shpitonkov M.I., Maltsev G.Yu. Oxidative distress in patients with polytrauma. *General Reanimatology*. 2014; 10 (2): 23–30. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-2-23-30>. [In Russ.]
3. Yakovlev A.Yu., Gushchina N.N., Niyazmatov A.A., Zaitsev R.M., Golubtsova E.Yu., Ryabikova M.A. Early evaluation of the efficiency of antibiotic therapy for nosocomial pneumonia by quantifying lipopolysaccharide. *General Reanimatology*. 2013; 9 (6): 45–52. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-6-45>. [In Russ.]
4. Moroz V.V., Golubev A.M., Marchenkov Yu.V., Vlasenko A.V., Kuzovlev A.N. Diagnostika ostrogo respiratornogo distress-sindroma pri nozokom-

6. Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Федорова М.С., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С. Нарушения nano-структуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. *Общая реаниматология*. 2011; 7 (2): 5–9. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2011-2-5>
7. Sender V., Stamme C. Lung cell-specific modulation of LPS-induced TLR4 receptor and adaptor localization. *Commun. Integr. Biol.* 2014; 7: e29053. <http://dx.doi.org/10.4161/cib.29053>. PMID: 25136402
8. Hou S., Ding H., Ly Q., Yin X., Song J., Landen N.X., Fan H. Therapeutic effect of intravenous infusion of perfluorocarbon emulsion on LPS-induced acute lung injury. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e87826. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087826>. PMID: 24489970
9. Yuan Q., Jiang Y.W., Fang Q.H. Improving effect of Sivelestat on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *APMIS*. 2014; 122 (9): 810–817. <http://dx.doi.org/10.1111/apm.12222>. PMID: 24484066
10. Zhao X.W., Zhang J.P., Wang X.G., Ma H.J., Xie J.H., Liu Y.N. Effects of aerosolized perfluorocarbon on gas exchange, respiratory mechanics and hemodynamics in a swine model of acute respiratory distress syndrome. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2006; 29 (2): 104–108. PMID: 16677452
11. Wang X., Zhang J., Li X., Liu Y., Yang H., Zhao X., Xie L., Yin L. Sustained improvement of gas exchange and lung mechanics by vaporized perfluorocarbon inhalation in piglet acute lung injury model. *Clin. Respir. J.* 2014; 8 (2): 160–166. <http://dx.doi.org/10.1111/crj.12053>. PMID: 24028088
12. Мороз В.В., Остапенко Д.А., Власенко А.В., Осипов П.Ю., Герасимов Л.В. Эндотрахеальное применение перфторана в условиях ИВЛ у больных с острым респираторным дистресс-синдромом. *Общая реаниматология*. 2005; 1 (2): 5–11. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2005-2-5-11>
13. Nakstad B., Wolfson M.R., Shaffer T.H., Kähler H., Lindemann R., Fugelseth D., Lyberg T. Perfluorochemical liquids modulate cell-mediated inflammatory responses. *Crit. Care Med.* 2001; 29 (9): 1731–1737. <http://dx.doi.org/10.1097/00003246-200109000-00013>. PMID: 11546973
14. Koch T., Ragaller M., Haufe M., Hofer A., Grosser M., Albrecht D.M., Kotzsch M., Luther T. Perfluorohexane attenuates proinflammatory and procoagulatory response of activated monocytes and alveolar macrophages. *Anesthesiology*. 2001; 94 (1): 101–109. <http://dx.doi.org/10.1097/0000542-200101000-00020>. PMID: 11135729
15. Thomassen M.J., Buhrow L.T., Wiedemann H.P. Perflubron decreases inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Crit. Care Med.* 1997; 25 (12): 2045–2047. <http://dx.doi.org/10.1097/00003246-199712000-00023>. PMID: 9403756
16. Gale S.C., Gorman G.D., Copeland J.G., McDonagh P.F. Perflubron emulsion prevents PMN activation and improves myocardial functional recovery after cold ischemia and reperfusion. *J. Surg. Res.* 2007; 138 (1): 135–140. PMID: 17173933
17. Chang H., Kuo F.C., Lai Y.S., Chou T.C. Inhibition of inflammatory responses by FC-77, a perfluorochemical, in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *Intensive Care Med.* 2005; 31 (7): 977–984. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-005-2652-y>. PMID: 15931525
18. Woods C.M., Neslund G., Kornbrust E., Flaim S.F. Perflubron attenuates neutrophil adhesion to activated endothelial cells *in vitro*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 278 (5): L1008–L1017. PMID: 10781432
19. Baba A., Kim Y.K., Zhang H., Liu M., Slutsky A.S. Perfluorocarbon blocks tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 release from alveolar epithelial cells *in vitro*. *Crit. Care Med.* 2000; 28 (4): 1113–1118. PMID: 10809292
20. Schoof E., von der Hardt K., Kandler M.A., Abendroth F., Papadopoulos T., Rascher W., Dötsch J. Aerosolized perfluorocarbon reduces adhesion molecule gene expression and neutrophil sequestration in acute respiratory distress. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 457 (2–3): 195–200. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02665-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02665-1). PMID: 12464366
21. mialnoi pnevmonii. Metodicheskie rekomendatsii. [Diagnosis of acute respiratory distress syndrome in nosocomial pneumonia. Guidelines]. Moscow: NIIOR RAMN; 2011. [In Russ.]
22. Kuzovlev A.N., Moroz V.V., Golubev A.M., Polovnikov S.G. Ingalyatsionnye antibiotiki v lechenii tyazhelei nozokomialnoi pnevmonii. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Inhaled antibiotics in the treatment of nosocomial pneumonia. *General Reanimatology*]. 2013; 9 (6): 61–70. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-6-61>. [In Russ.]
23. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Fedorova M.S., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S. Narusheniya nanostrukturny membran eritrotsitov pri ostroi krovopote i ikh korrektsiya perftoruglerodnoi emulsiei. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Impairments in the nanostructure of red blood cell membranes in acute blood loss and their correction with perfluorocarbon emulsion. *General Reanimatology*]. 2011; 7 (2): 5–9. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2011-2-5>. [In Russ.]
24. Sender V., Stamme C. Lung cell-specific modulation of LPS-induced TLR4 receptor and adaptor localization. *Commun. Integr. Biol.* 2014; 7: e29053. <http://dx.doi.org/10.4161/cib.29053>. PMID: 25136402
25. Hou S., Ding H., Ly Q., Yin X., Song J., Landen N.X., Fan H. Therapeutic effect of intravenous infusion of perfluorocarbon emulsion on LPS-induced acute lung injury. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e87826. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087826>. PMID: 24489970
26. Yuan Q., Jiang Y.W., Fang Q.H. Improving effect of Sivelestat on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *APMIS*. 2014; 122 (9): 810–817. <http://dx.doi.org/10.1111/apm.12222>. PMID: 24484066
27. Zhao X.W., Zhang J.P., Wang X.G., Ma H.J., Xie J.H., Liu Y.N. Effects of aerosolized perfluorocarbon on gas exchange, respiratory mechanics and hemodynamics in a swine model of acute respiratory distress syndrome. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2006; 29 (2): 104–108. PMID: 16677452
28. Wang X., Zhang J., Li X., Liu Y., Yang H., Zhao X., Xie L., Yin L. Sustained improvement of gas exchange and lung mechanics by vaporized perfluorocarbon inhalation in piglet acute lung injury model. *Clin. Respir. J.* 2014; 8 (2): 160–166. <http://dx.doi.org/10.1111/crj.12053>. PMID: 24028088
29. Moroz V.V., Ostapchenko D.A., Vlasenko A.V., Osipov P.Yu., Gerasimov L.V. Endotrachealnoe primenenie perftorana v usloviyakh IVL u bolnykh s ostrym respiratornym distress-sindromom. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Endotracheal use of perfluorane in patients with acute respiratory distress syndrome under artificial ventilation. *General Reanimatology*]. 2005; 1 (2): 5–11. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2005-2-5-11>. [In Russ.]
30. Nakstad B., Wolfson M.R., Shaffer T.H., Kähler H., Lindemann R., Fugelseth D., Lyberg T. Perfluorochemical liquids modulate cell-mediated inflammatory responses. *Crit. Care Med.* 2001; 29 (9): 1731–1737. <http://dx.doi.org/10.1097/00003246-200109000-00013>. PMID: 11546973
31. Koch T., Ragaller M., Haufe M., Hofer A., Grosser M., Albrecht D.M., Kotzsch M., Luther T. Perfluorohexane attenuates proinflammatory and procoagulatory response of activated monocytes and alveolar macrophages. *Anesthesiology*. 2001; 94 (1): 101–109. <http://dx.doi.org/10.1097/0000542-200101000-00020>. PMID: 11135729
32. Thomassen M.J., Buhrow L.T., Wiedemann H.P. Perflubron decreases inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Crit. Care Med.* 1997; 25 (12): 2045–2047. <http://dx.doi.org/10.1097/00003246-199712000-00023>. PMID: 9403756
33. Gale S.C., Gorman G.D., Copeland J.G., McDonagh P.F. Perflubron emulsion prevents PMN activation and improves myocardial functional recovery after cold ischemia and reperfusion. *J. Surg. Res.* 2007; 138 (1): 135–140. PMID: 17173933
34. Chang H., Kuo F.C., Lai Y.S., Chou T.C. Inhibition of inflammatory responses by FC-77, a perfluorochemical, in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *Intensive Care Med.* 2005; 31 (7): 977–984. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-005-2652-y>. PMID: 15931525
35. Woods C.M., Neslund G., Kornbrust E., Flaim S.F. Perflubron attenuates neutrophil adhesion to activated endothelial cells *in vitro*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 278 (5): L1008–L1017. PMID: 10781432
36. Baba A., Kim Y.K., Zhang H., Liu M., Slutsky A.S. Perfluorocarbon blocks tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 release from alveolar epithelial cells *in vitro*. *Crit. Care Med.* 2000; 28 (4): 1113–1118. PMID: 10809292
37. Schoof E., von der Hardt K., Kandler M.A., Abendroth F., Papadopoulos T., Rascher W., Dötsch J. Aerosolized perfluorocarbon reduces adhesion molecule gene expression and neutrophil sequestration in acute respiratory distress. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 457 (2–3): 195–200. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02665-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02665-1). PMID: 12464366

Поступила 18.08.14

Submitted 18.08.14