

# МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕХНОЛОГИИ

---

УДК 616.24-008.7, 616-073.26, 543.544.943.3.068.7

DOI 10.17816/pmj36135-44

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К НЕИНВАЗИВНОМУ СБОРУ БИОПРОБ ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА

*А.И. Шмырова<sup>1\*</sup>, И.М. Пшеничникова-Пеленева<sup>2</sup>, Л.И. Кононова<sup>3</sup>, В.П. Коробов<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Институт механики сплошных сред Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь,*

<sup>2</sup>*Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера,*

<sup>3</sup>*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия*

## UPDATING OF METHODOLOGICAL APPROACHES TO NONINVASIVE SAMPLING OF PULMONARY SURFACTANT BIOSAMPLES

*A.I. Shmyrova<sup>1\*</sup>, I.M. Pshenichnikova-Peleneva<sup>2</sup>, L.I. Kononova<sup>3</sup>, V.P. Korobov<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Continuum Mechanics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm,*

<sup>2</sup>*E.A. Vagner Perm State Medical University,*

<sup>3</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

---

**Цель.** Изучить влияние условий сбора и хранения биопроб легочного сурфактанта (ЛС) в барботате выдыхаемого воздуха на его поверхностную активность и биохимическую структуру для разработки клинических рекомендаций по оценке состояния ЛС.

**Материалы и методы.** Исследованы емкости из стекла, фторопласта и пяти полимерных контейнеров методами тензиометрии. Оценка воспроизводимости результатов физико-химических параметров нативного материала проводилась с помощью тонкослойной хроматографии. Тарирование методов и составление шкал осуществлялось с использованием раствора экзогенного сурфактанта.

**Результаты.** Обнаружено, что для идентификации в пробах фосфатидилхолина необходимо внести не менее 0,15 мкг экзогенного сурфактанта, а для дипальмитоилфосфатидилхолина – от 0,5 мкг и вы-

---

© Шмырова А.И., Пшеничникова-Пеленева И.М., Кононова Л.И., Коробов В.П., 2019

тел. +7 (342) 237 83 14

e-mail: lutsik@icmm.ru

[Шмырова А.И. (\*контактное лицо) – кандидат физико-математических наук, младший научный сотрудник лаборатории Гидродинамической устойчивости; Пшеничникова-Пеленева И.М. – доктор медицинских наук, профессор кафедры фтизиопульмонологии; Кононова Л.И. – инженер лаборатории биохимии развития микроорганизмов; Коробов В.П. – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биохимии развития микроорганизмов].

ше. Эффективность сбора ЛС методом барботирования выдыхаемого воздуха варьируется в пределах от 30 до 50 % от объема сурфактанта, выделяемого при одном среднестатистическом выдохе человека.

**Выводы.** Осуществлен сбор нативного материала методом барботирования выдыхаемого воздуха. Составлены тензиометрическая и хроматографическая шкалы. Отмечена вариативность степени сбора. Показано, что при соблюдении условий хранения и транспортировки в материале не происходит заметных изменений.

**Ключевые слова.** Легочный сурфактант, туберкулез легких, методы исследования поверхностного натяжения, автоматизация диагностических методов, тензиометрия, тонкослойная хроматография.

**Aim.** To study the influence of conditions of sampling and storage of pulmonary surfactant (PS) biosamples in the exhaled air barbotate on its surface activity and biochemical structure, so as to develop clinical recommendations for PS status assessment.

**Materials and methods.** Tensiometry methods were used to study the glass, fluoroplastic and five polymer containers. Reproducibility of the results of physicochemical parameters of native material was assessed using thin-layer chromatography. Calibration of methods and scaling was implemented using exogenous surfactant solution.

**Results.** It was detected that for identification of phosphatidylcholine in the samples, it is necessary to introduce not less than 0.15 mcg of exogenous surfactant and for dipalmitoylphosphatidylcholine – from 0.5 mcg and more. The efficiency of PS sampling with the method of exhaled air barbotage varies from 30 % to 50 % from the volume of surfactant, excreted with one average statistical human expiration.

**Conclusions.** Sampling of native material using the method of exhaled air barbotage was performed. Tensiometric and chromatographic scales were compiled. Variability of sampling degree was noted. It was shown that if the conditions of storage and transport are observed, there are no marked changes in the material.

**Key words.** Pulmonary surfactant, pulmonary tuberculosis, methods for surface tension study, automatization of diagnostic methods, tensiometry, thin-layer chromatography.

## ВВЕДЕНИЕ

Нарушения сурфактантной системы легких лежат в основе многих пневмопатий, в частности туберкулеза легких [5, 8, 9, 12, 14, 20, 22, 26–29]. При этом заболевания приводят к изменению состава и нарушению поверхностно-активных свойств легочной жидкости, основной компонентой которой является легочный сурфактант. Легочный сурфактант (ЛС) – это комплекс поверхностно-активных липопротеинов [19], обеспечивающий антиателектатическую (предупреждение спадания альвеол на выдохе), защитную, противоотечную, антифибротическую функции. Поверхностно-активные свойства легочного сурфактанта обусловлены количеством, соотношением и взаимодействием входящих в его состав фосфолипидов, формирующих монослойную мембрану на раз- деле фаз жидкость – воздух.

Антиателектатическая функция ЛС нарушается при развитии специфического процесса, результатом которого является накопление микроателектазы и дистелектазы в участке инфильтрации и вокруг него [19]. Раннее обнаружение нарушений функции ЛС и его биохимического состава чрезвычайно важно при обследовании недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом новорожденных, больных с тяжелыми нарушениями дыхания и хронической обструктивной болезнью легких, альвеолитами, прочими диссеминированными процессами в легких и другими пневмопатиями, при определении показаний для заместительной терапии экзогенными сурфактантами с оценкой ее эффективности.

Изучение патологии сурфактантной системы легких позволит значительно улучшить функциональную диагностику многих заболеваний легких, а также найти новые подходы

к их патогенетической терапии. На сегодняшний день сбор биологического материала для исследования ЛС осуществляется инвазивным методом бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) при проведении фибробронхоскопии [10, 13, 16, 17, 26]. Как правило, в клинических образцах состояние ЛС оценивается путем изучения его поверхностной активности и биохимического состава. Высокое содержание ЛС в образцах жидкости бронхоальвеолярного лаважа дает возможность прямого использования методов тензиометрии для получения зависимости поверхностного давления от площади субфазы (изотерма Ленгмюра), необходимой для оценки индекса активности сурфактанта [10] и его сжимаемости [13]. Однако этот метод является инвазивным, трудоемким, имеет ряд противопоказаний. Существуют также и неинвазивные методы сбора материала ЛС: метод конденсации [3, 15, 23, 24] и барботирования выдыхаемого воздуха (БВВ) [18]. Метод БВВ является инновационным. Для его клинического внедрения предстоит выработать стандартизацию сбора и хранения биопроб ЛС, провести сравнительный анализ результатов, полученных методом БВВ, с результатами, полученными другими методами.

*Цель исследования* – изучить влияние условий сбора и хранения биопроб ЛС в БВВ на его поверхностную активность и биохимическую структуру для разработки клинических рекомендаций по оценке состояния ЛС.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование проводили в три этапа.

Этап 1. Подбор емкостей для хранения и транспортировки биопроб ЛС (нативный материал).

Этап 2. Определение чувствительности экспериментальных методов и составление тензиометрической и хроматографической шкал, позволяющих количественно оценить содержание ЛС в собираемом БВВ.

Этап 3. Оценить предельно допустимые сроки и оптимальные условия хранения биологического материала, не влияющие на поверхностные и биохимические свойства содержащегося в нем ЛС.

На первом этапе для отбора стандартизованных элементов, предназначенных для сбора, транспортировки и хранения нативного материала, в работе были проведены исследования чистоты емкостей из стекла («МиниМед», Россия, 70 мл), фторопласта («Первый фторопластовый завод», Россия, 50 мл), а также одноразовых полимерных контейнеров для взятия образцов биоматериала («Елатомский приборный завод», Россия, 100 мл; «Компания Солнышко», Россия, 100 мл; «КЭРРОТ», Россия, 60 мл; «Vitlab», Германия, 70 мл; «ZG Medical Technology», Китай, 60 мл). Предварительная подготовка лабораторной посуды из стекла и фторопласта проводилась с использованием смеси водного раствора дихромата калия и концентрированной серной кислоты. На завершающем этапе подготовки емкости промывались проточной и бидистиллированной деионизированной водой проводимостью менее 1 мкСм/см. Одноразовые полимерные контейнеры не подвергались предварительной очистке, а заполнялись водой сразу же после вскрытия. Чистота контейнеров и эволюция загрязнения жидкости на длительных временных интервалах хранения при контакте ее со стенками емкости определялась путем измерения поверхностного натяжения воды ( $\sigma$ ), частично заполняющей химическую посуду, методом отрыва кольца [3]. По-

скольку основным критерием чистоты емкостей для сбора нативного материала является величина максимального изменения поверхностного давления ( $\pi_{\max}$ ) воды на изотерме сжатия (зависимость  $\pi$  от площади поверхностной фазы) при минимальной площади поверхности (9,9 % от начальной), то дальнейшее исследование искомой жидкости проходило в лотке Ленгмюра с помощью погруженной в воду пластинки Вильгельми [3].

Для оценки степени загрязнения проб в исследуемых емкостях при стандартных сроках и условиях хранения биоматериала в работе были проведены измерения поверхностного натяжения воды, заполняющей контейнеры через 2,5 ч, 7 и 14 сут.

На 2-м этапе для определения чувствительности методов и составления хроматографической и тензиометрической шкал, позволяющих количественно оценивать содержание различных компонентов легочного сурфактанта в собираемом нативном материале, в работе были проведены исследования проб, содержащих натуральный животный сурфактант («Сурфактант-VL», «Биосурф», Россия [2, 21, 25]). Сурфактант-VL является лекарственным препаратом для заместительной терапии острой недостаточности легочного сурфактанта и представляет собой бронхоальвеолярный смыв из легких телят, содержащий смесь фосфолипидов и сурфактантассоциированных белков. Препарат выпускается в виде лиофилизата в количестве 75 мг для приготовления эмульсии для эндотрахеального, эндобронхиального и ингаляционного введения. Хранится в защищенном от света месте при температуре не выше  $-5$  °С. Для калибровки методов был использован раствор «Сурфактанта-VL» в хлороформе (0,01 мг/мл), 1 мкл которого, по

нашим оценкам, содержит объем ЛС, равный объему сурфактанта, выделяемого при одном среднестатистическом выдохе человека – 5–10 нг [23, 24]. Для создания хроматографической шкалы искомый раствор вводился в 2 мл физиологического раствора в объемах 50, 100, 200, 400, 800 мкл.

Процедура экстракции липидов проводилась по методу Блайя и Дайера [6], который был адаптирован для работы с водными эмульсиями. Тонкослойная хроматография (ТСХ) проводилась с использованием пластин Sorbfil (сорбент – силикагель, толщина слоя 110 мкм, «Сорбполимер», Россия). Разделение смеси липидов выполняли в системе хлороформ – метанол – вода (65:25:4 об/об). Для идентификации липидов после разделения использовали окрашивание пластин 3%-ным раствором ацетата меди в 8%-ной серной кислоте и 10%-ной фосфорномолибденовой кислотой в 70%-ном этаноле для определения общего состава липидов, 0,25%-ным нингидрином в ацетоне – липидов, содержащих свободные аминокислоты, реактивом Цинцаде – фосфолипидов,  $\alpha$ -нафтолом – гликолипидов, реактивом Драгендорфа – холинсодержащих липидов, а также сравнением со скоростью движения маркеров липидов фосфатидилглицерина (ФГ), кардиолипина (КЛ), фосфатидилхолина (ФХ), дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), сфингомиелина (СМ), пальмитиновой кислоты (ПК), моно-, ди- и триглицеридов [1, 11].

Тарирование метода втягивающейся пластинки Вильгельми осуществлялось измерением величины  $\pi_{\max}$  при последовательном нанесении раствора «Сурфактанта-VL» в хлороформе на предварительно очищенную барьерным методом поверхность физиологического раствора в барьерной системе Ленгмюра.

На 3-м этапе исследования проводилась оценка воспроизводимости результатов физико-химических и биохимических параметров собираемого материала в группе здоровых добровольцев в зависимости от времени и условий хранения БВВ с помощью ТСХ и методами тензиометрии. Было обследовано 5 здоровых добровольцев: женщины в возрасте 26 лет и 31 года, мужчины в возрасте 37, 42 и 47 лет. БВВ собирался при совершении 30 полных последовательных выдохов в 2 мл физиологического раствора в течение 180 с при комнатной температуре. От каждого испытуемого отбирались три пробы ЛС с интервалом в неделю с последующим одновременным исследованием. Сбор и исследование искомым веществ осуществлялись в полипропиленовые пробирки объемом 14 мл. Липидные экстракты для ТСХ изготавливались также по методу Блайя и Дайера, разделение фосфолипидов клинических образцов проводилось в сравнении с изолированными фосфолипидами (свидетелями) и липидным экстрактом из «Сурфактанта-VL». Хранение и транспортировка проб и нативного материала осуществлялись при температуре  $+7,0 \pm 0,5$  °С.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Этап 1. Результаты измерений поверхностного натяжения и максимального изменения поверхностного давления воды методами тензиометрии при различном времени контакта жидкости со стенками контейнеров представлены в таблице.

Из анализа данных, приведенных в таблице, можно сделать вывод о том, что вода, вступая в контакт со стенками контейнеров фирмы «Компания Солнышко» и «ZG Medical Technology», загрязняется компонентами материалов, используемых при их изготовлении. Величина поверхностного натяжения падает с табличного значения  $72,3 \pm 0,1$  до  $56,5 \pm 0,1$  и  $66,2 \pm 0,1$  мН/м соответственно. Через 2,5 ч хранения воды в указанных емкостях наблюдается дальнейшее уменьшение поверхностного натяжения до  $51,9 \pm 0,1$  и  $63,2 \pm 0,5$  мН/м. По этой причине полипропиленовые (ПП) контейнеры «Компания Солнышко» и «ZG Medical Technology», в которых выявлялось существенное изменение поверхностного натяжения воды, были исключены из дальнейшей работы. В остальных емкостях при хранении в течение 14 сут

### Временная эволюция поверхностного натяжения и максимального изменения поверхностного давления воды, контактирующей со стенками тестируемых емкостей

Контейнер	$\sigma$ , мН/м			$\pi_{\max}$ , мН/м	
	Время контакта воды со стенками контейнера				
	0	2,5 ч	14 сут	0	10 сут
«МиниМед», Россия, 70 мл	$72,3 \pm 0,1$	$72,0 \pm 0,1$	$72,1 \pm 0,1$	$0,45 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,05$
«Первый фторопластовый завод», Россия, 50 мл	$72,3 \pm 0,1$	$72,0 \pm 0,1$	$72,1 \pm 0,1$	$0,45 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,05$
«Елатомский приборный завод», Россия, 100 мл	$72,2 \pm 0,1$	$72,0 \pm 0,1$	$72,3 \pm 0,1$	$0,45 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,05$
«Компания Солнышко», Россия, 100 мл	$56,5 \pm 0,1$	$51,9 \pm 0,1$	–	–	–
«КЭРРОТ», Россия, 60 мл	$72,3 \pm 0,1$	$71,9 \pm 0,1$	$72,0 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,05$
«Vitlab», Германия, 70 мл	$72,2 \pm 0,1$	$71,8 \pm 0,1$	$72,0 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$0,45 \pm 0,05$
«ZG Medical Technology», Китай, 60 мл	$66,2 \pm 0,1$	$63,2 \pm 0,5$	–	–	–
Табличные значения при температуре $23,0 \pm 0,1$ °С	$72,3 \pm 0,1$			$0,2 \pm 0,05$	

Примечание:  $\sigma$  – поверхностное натяжение;  $\pi_{\max}$  – величина максимального изменения поверхностного давления.

поверхностное натяжение остается неизменным и близко к табличному значению.

Оставшиеся после первичного отбора емкости проходили проверку с использованием барьерной системы Ленгмюра. Результаты показали, что наименьшее изменение поверхностного давления воды наблюдается при хранении ее в контейнерах «МиниМед», «Первый фторопластовый завод» и «Елатомский приборный завод».

С нашей точки зрения, в качестве емкости для сбора и хранения биологического материала наиболее целесообразно использовать контейнеры ОАО «Елатомский приборный завод», так как именно они сочетают в себе чистоту, доступность в приобретении и не приводят к накоплению поверхностно-активных примесей при длительном использовании. Несмотря на то что химическая посуда из стекла и фторопласта также удовлетворяет критериям чистоты, необходимо учитывать тот факт, что перед использованием эти емкости проходили предварительную очистку водным раствором бихромата калия с серной кислотой. Кроме того, стеклянная посуда менее устойчива к внешним воздействиям, а посуда из фторопласта значительно дороже, чем емкости из ПП.

Этап 2. Исследование состава ЛС на примере раствора экзогенного сурфактанта в хлороформе методом ТСХ показало, что для получения более эффективных результатов необходимо исключить этап очистки липидов, после которой на пластинках практически отсутствовали пятна ДПФХ.

При разделении фосфолипидов «Сурфактанта-ВЛ» и идентификации его состава с помощью свидетелей и специального окрашивания выявлены следующие фракции, расположенные последовательно по мере подъема фронта растворителя: СМ, ФХ, в со-

став которого входил ДПФХ, а также ФГ, КЛ, ФЭА. Отмечено большее содержание ФХ и ФЭА по сравнению с другими фракциями. Такой спектр фосфолипидов обусловлен естественной природой препарата, а именно происхождением его из бронхоальвеолярных смывов. Следует отметить, что количество выявляемых фракций зависело от концентрации препарата при нанесении на пластинку, всего два фосфолипида (ФХ и ФЭА) определялись в пробе, содержащей 50 мкл раствора «Сурфактанта-ВЛ», все пять фракций – в пробах, содержащих 400 и 800 мкл раствора ЛС. Интенсивность окрашивания и площади пятен фосфолипидов «Сурфактанта-ВЛ» на хроматограмме пропорционально зависели от количества нанесенного вещества. Показано, что интенсивность окраски пятен возрастает с ростом концентрации ЛС в системе. Обнаружено, что для идентификации в пробах ФХ в физиологический раствор необходимо внести не менее 30 мкл раствора животного ЛС, а для ДПФХ – от 100 мкл и выше (рис. 1).

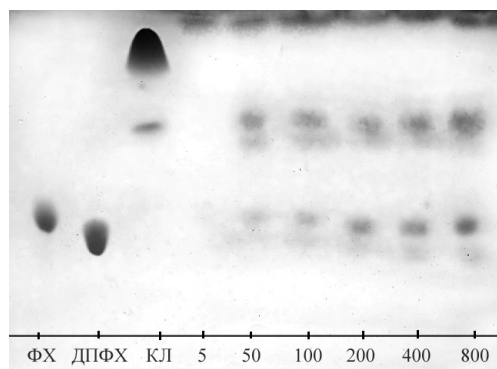


Рис. 1. Результаты ТСХ проб, содержащих 5, 50, 100, 200, 400 и 800 мкл раствора «Сурфактанта-ВЛ» в хлороформе, и маркеров ФХ, ДПФХ и КЛ

Этап 3. Экстракция и разгонка сурфактантных фосфолипидов БВВ здоровых лиц проводились без очистки. При хроматогра-

фическом исследовании фосфолипидного спектра БВВ здоровых добровольцев выявлено, что он незначительно отличается от спектра «Сурфактанта-VL» (рис. 2). В пробах БВВ определялись те же фосфолипиды, что и в «Сурфактанте-VL»: ФХ, ФГ, ФЭА, КЛ, причем, ФЭА и КЛ в несколько больших количествах. Отличия фосфолипидного спектра БВВ от «Сурфактанта-VL» и минорное содержание ФХ можно объяснить различиями в получении материалов исследования. С помощью барботирования выдыхаемого воздуха собирается микроаэрозоль внутрилегочной жидкости, который формируется при механических колебательных процессах в легочной паренхиме и бронхиальном дереве и представляет собой смесь легочного и бронхиального сурфактантов, в то время как Сурфактант-VL получают путем смывания только легочного сурфактанта с поверхности альвеол. Бронхиальный и легочный сурфактант отличаются друг от друга соотношением фосфолипидов и сурфактантных апопротеинов В и С [7].

При изучении стабильности фосфолипидного спектра БВВ при температуре хранения материала  $+7,0 \pm 0,5$  °С в течение 7 сут установлено, что из спектра исчезают минорные фракции ФХ и ФГ. Напротив, судя по интенсивности и площади пятен, ФЭА и КЛ сохраняются с прежней концентрацией и через две недели хранения.

Оценка воспроизводимости результатов физико-химических параметров БВВ методами тензиометрии в те же временные интервалы показала, что при соблюдении температурных условий хранения и транспортировки анализов в исследуемом материале не происходит заметных изменений, связанных со «старением» пробы.

На этапе определения чувствительности метода втягивающейся пластинки Вильгельми в барьерной системе Ленгмюра и составления тензиометрической шкалы было проведено сопоставление изотерм «Сурфактанта-VL» и нативного материала, собранного методом БВВ (рис. 3), с результатами биохимического исследования.

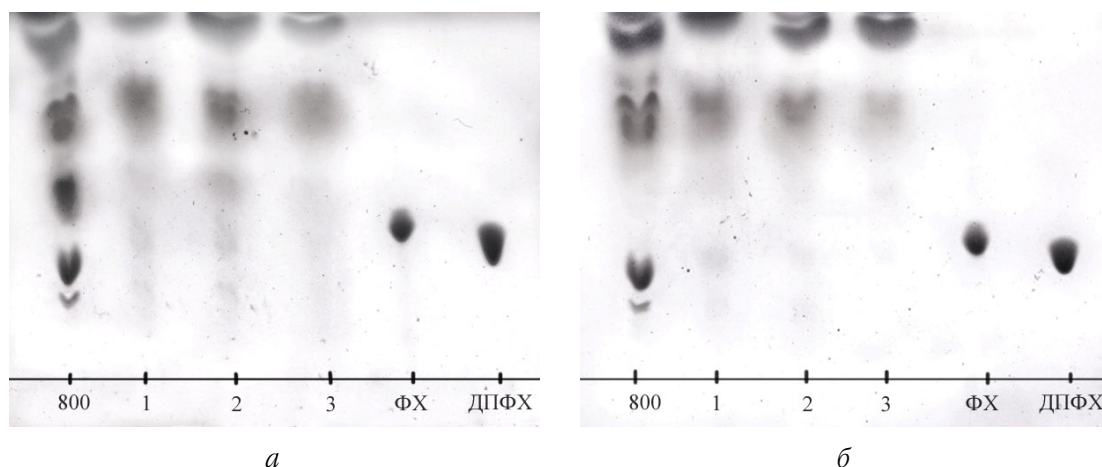


Рис. 2. Результаты ТСХ проб, содержащих 800 мкл раствора «Сурфактанта-VL», нативного материала двух здоровых добровольцев (а, б): 1 – свежесобранный анализ; 2 – после недельного хранения; 3 – после двух недель хранения и маркеров ФХ, ДПФХ

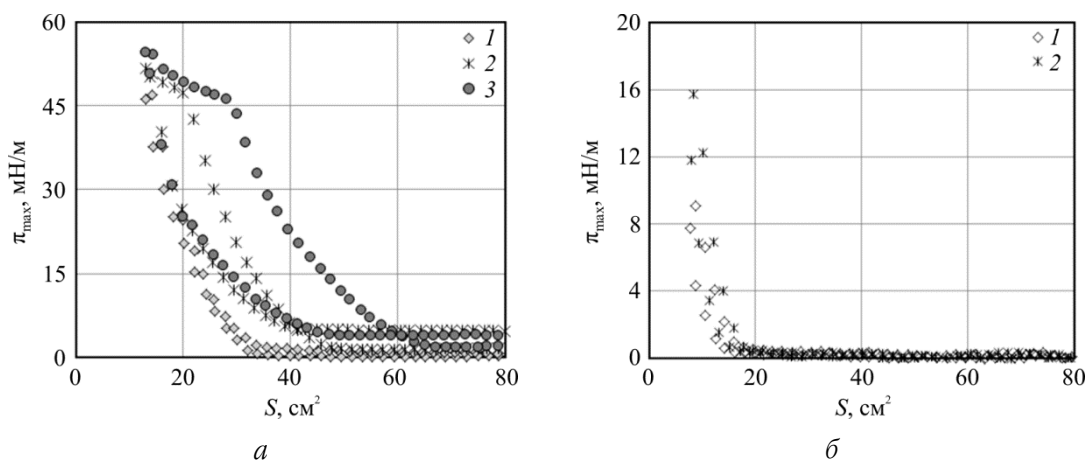


Рис. 3. Изотермы сжатия – растяжения Сурфактанта-BL (а) при нанесении на границу раздела 5 (1), 7 (2) и 10 (3) мкг вещества и легочного сурфактанта, собранного методом БВВ (б) после 50 (1) и 100 (2) выдохов\*

Сравнение показало, что эффективность сбора ЛС методом БВВ может значительно варьироваться от реализации к реализации в пределах от 30 до 50 % от объема сурфактанта, выделяемого при одном среднестатистическом выдохе человека [23, 24]. Показано, что для получения изотермы с участком жидкорасширенного фазового состояния необходимо произвести не менее 50 выдохов в процессе барботирования при максимально возможной эффективности сбора.

Таким образом, эффективность неинвазивного метода сбора биопроб легочного сурфактанта зависит от характеристик лабораторной посуды, особенностей сбора и хранения нативного материала. Рассмотренные условия сбора БВВ позволяют адекватно извлекать аэрозоль легочной жидкости, хранить биопробы и исследовать биохимические и поверхностно-активные свойства ЛС,

а значит, ускорят внедрение экспериментальных методов в клиническую практику.

## Выводы

1. Отобран образец одноразового пластикового контейнера («Елатомский приборный завод») для сбора и хранения биопроб ЛС, отвечающий требованиям чистоты проведения исследований методами тензиометрии биологических жидкостей. Показано, что контейнеры ОАО «Компания Солнышко» и «ZG Medical Technology» не отвечают требованиям для использования их как в пилотных экспериментах, так и в клинической практике, где изменение значений поверхностного натяжения является основным параметром для анализа результатов.

2. Разработаны шкалы количественного содержания ЛС в БВВ на основании тензиометрического и хроматографического

\* Изотермы представляют собой замкнутые кривые, полученные при непрерывном измерении поверхностного давления при одном цикле сжатия – растяжения поверхности.



исследований биопроб ЛС в БВВ в сравнении с «Сурфактантом-ВЛ». Выявлена вариативность степени сбора.

3. Методом ТСХ установлено, что при соблюдении температурного режима хранения и транспортировки в исследуемом материале наблюдается снижение концентрации минорных липидных фракций к концу первой недели хранения со стабильным содержанием основных фракций в течение двух недель. Таким образом стабильный уровень поверхностной активности БВВ позволяет хранить биопробы ЛС на протяжении двух недель до проведения исследований.

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-41-590095 р\_а.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир 1975; 326.
2. Розенберг О.А., Ловачева О.В., Шаповалов К.Г., Акулова Е.А., Степанова О.В., Сейлиев А.А., Шульга А.Э. Сурфактант-терапия в комплексном лечении больных бронхиальной астмой. Влияние на клинические симптомы и показатели функции внешнего дыхания. Туберкулез и болезни легких 2018; 96 (9): 23–304.
3. Русанов А.И., Прохоров В.А. Межфазная тензиометрия. СПб.: Химия 1994; 400.
4. Сидоренко Г.И., Зборовский Э.И., Левина Д.И. Поверхностно-активные свойства конденсата выдыхаемого воздуха (новый способ исследования функций легких). Терапевтический архив 1980; 3: 65–68.
5. Baritussio A. Lung surfactant, asthma, and allergens – a story in evolution. Am. J. of Respir. Crit. Care Med. 2004; 169(5): 550–551.
6. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 1959; 37(8): 911–917.
7. Bernhard W., Haagsman H.P., Tschernig T., Poets C.F. Conductive airway surfactant: surface-tension function, biochemical composition, and possible alveolar origin. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1997; 17(1): 41–50.
8. Chimote G., Banerjee R. Effect of mycobacterial lipids on surface properties of Curosurf (TM): Implications for lung surfactant dysfunction in tuberculosis. Resp. Phys. Neurobi. 2008; 162(1): 73–79.
9. Chimote G., Banerjee R. Lung surfactant dysfunction in tuberculosis: Effect of mycobacterial tubercular lipids on dipalmitoylphosphatidylcholine surface activity. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2005; 45 (3–4): 215–223.
10. Clements J. Pulmonary surface tension and alveolar stability. Technical report. CRDLR. U.S. Army Chemical Research and Development Laboratories 1961; 16: 444–450.
11. Fewster M.E., Burns B.J., Mead J.F. Quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids using copper acetate reagent. J. Chromatogr. A. 1969; 43(1): 120–126.
12. Hasegawa T., Leblanc R.M. Aggregation properties of mycolic acid molecules in monolayer films: a comparative study of compounds from various acid-fast bacterial species. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes 2003; 1617 (1–2): 89–95.
13. Hildebran J. Pulmonary surface film stability and composition. J. of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology 1979; 47(3): 604–611.
14. Hobfeld J. The role of surfactant in asthma. J. Respiratory Research 2001; 3: 1–8.
15. Horvath I., Hunt J., Barnes P.J. Exhaled breath condensate: Methodological recommendations and unresolved questions. European Respiratory J. 2005; 26: 523–548.

16. Klech H., Pohl W. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). *European Respiratory J.* 1989; 2(6): 561–585.
17. Meyer K. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 28(5): 546–560.
18. Mizev A., Shmyrova A., Mizeva I., Psbenichnikova-Peleneva I. Exhaled breath barbotage: A new method of pulmonary surfactant dysfunction assessing. *J. of Aerosol Science* 2018; 115: 62–69.
19. Notter R. Lung surfactants: basic science and clinical applications (lung biology in health and disease). P.: CRC Press 2000; 464.
20. Ragbavendran K., Willson D., Notter R.H. Surfactant therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Clinics* 2011; 27(3): 525–559.
21. Rosenberg O.A., Bautin A.E., Seiliev A.A. Late start of surfactant therapy and surfactant drug composition as major causes of failure of phase III multi-center clinical trials of surfactant therapy in adults with ARDS. *Inter. J. of Biomedicine* 2018; 8(3): 253–25.
22. Schwab U., Rohde K.H., Wang Z., Chess P.R., Notter R.H., Russell D.G. Transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to lung surfactant. *Microbial Pathogenesis* 2009; 46(4): 185–193.
23. Schwarz K., Biller H., Windt H., Koch W., Hoblfeld J.M. Characterization of exhaled particles from the healthy human lung – a systematic analysis in relation to pulmonary function variables. *J. of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* 2010; 23 (6): 371–379.
24. Schwarz K., Biller H., Windt H., Koch W., Hoblfeld J.M. Characterization of exhaled particles from the human lungs in airway obstruction. *J. of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* 2015; 28(1): 52–58.
25. Stepanova O.V., Akulova E.A., Kochneva A.A., Seiliev A.A., Shulga A.Ed., Lovacheva O.V., Lukyanov S.A., Shapovalov K.G., Volchkov V.A., Rosenberg O.A. Influence of natural lung surfactant inhalations on clinical symptoms and pulmonary function parameters in patients with bronchial asthma. Communication 1. *Inter. J. of Biomedicine* 2016; 6(4): 255–258.
26. Walters E., Gardiner P. Bronchoalveolar lavage as a research tool. *Thorax* 1991; 46(9): 613–618.
27. Wang Z., Schwab U., Rboades E., Chess P.R., Russell D.G., Notter R.H. Peripheral cell wall lipids of *mycobacterium tuberculosis* are inhibitory to surfactant function. *Tuberculosis* 2008; 88(3): 178–186.
28. Willson D., Chess P.R., Notter R.H. Surfactant for pediatric acute lung injury. *Pediatric Clinics of North America* 2008; 55(3): 545–575.
29. Wright T.W., Notter R.H., Wang Z., Harmsen A.G., Gigliotti F. Pulmonary inflammation disrupts surfactant function during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infection and Immunity* 2001; 69: 758–764.

Материал поступил в редакцию 21.11.2018