

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ СУРФАКТАНТА НА ЛЕГОЧНЫЕ МАКРОФАГИ IN VITRO У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХОЭКТАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Чл.-корр. НАМНУ В. В. БОЙКО^{1,2}, П. И. КОРЖ^{1,3},
проф. В. В. МАКАРОВ², доц. Д. В. МИНУХИН²

¹ ГУ «Институт общей и неотложной хирургии имени В. Т. Зайцева НАМНУ», Харьков,

² Харьковский национальный медицинский университет,

³ Харьковская медицинская академия последипломного образования, Украина

Изучено активирующее влияние препаратов сурфактанта на легочные макрофаги in vitro у пациентов с бронхоэктатической болезнью в стадии обострения. Результаты электронно-микроскопического исследования макрофагальных элементов бронхоальвеолярного смыва у больных свидетельствуют о том, что после инкубации клеток с куросурфом появляется выраженная картина активации клеточной поверхности, формирования фагоцитарных вакуолей, содержащих мембраны экзогенного сурфактанта.

Ключевые слова: бронхоэктатическая болезнь, сурфактант, легочные макрофаги.

В многочисленных отечественных и зарубежных фундаментальных исследованиях показана ведущая роль макрофагов в регрессии хронического рецидивирующего воспаления [1]. Доказано, что слабоактивированные макрофаги, содержащие значительные количества бактерий, гибнут. При этом высвобожденные бактерии вновь фагоцитируются, и только высокоактивированные макрофаги, накопившиеся под влиянием иммунных процессов, способны к выполнению своих «функций» [2].

В последние годы опубликовано значительное количество работ, посвященных изучению сурфактанта при воспалительных заболеваниях легких [3]. Данные ряда исследователей показали, что состояние сурфактантной системы легких при хроническом воспалении нарушает их структурную организацию, вызывает сдвиги в сурфактантной системе, выраженность которых зависит от степени повреждения альвеолярной паренхимы [4].

Отек и клеточная пролиферация нарушают условия микроциркуляции жидкости и кровоснабжения клеточных элементов стенки альвеолы, вследствие чего снижается интенсивность внутриклеточных метаболических процессов в альвеолоцитах II типа, вырабатывающих сурфактант. Разрушение клеток аэрогематического барьера сопровождается изменениями в системе легочного сурфактанта, его дефицитом, развитием дис- и ателектазов, что усугубляет тяжесть поражения легких и способствует прогрессированию бронхоэктатической болезни (БЭБ) [5].

Есть сведения о том, что сурфактант обладает защитными свойствами относительно легочной паренхимы и всех элементов альвеолярно-капиллярной мембраны (альвеолярного эпителия, эндотелия легочных капилляров и интерстициальных компонентов) [6].

Экзогенно введенный сурфактант восстанавливает локальный иммунитет и служит субстратом для синтеза собственного сурфактанта [7].

Цель данного исследования — изучить стимулирующее действие природного сурфактанта на рецепторы легочных макрофагов, его влияние на активацию фагоцитоза.

В нашей работе представлены результаты сравнительного изучения прямого влияния инфосурфа (отечественного препарата сурфактанта) на клеточную поверхность и формирование фагоцитарных вакуолей у макрофагальных элементов больных с БЭБ в стадии обострения. Для этого использовали макрофаги бронхоальвеолярного смыва (БАС) у 22 некурящих больных в возрасте 19–56 лет, у которых диагностирована БЭБ в стадии обострения, макрофаги составляли 83–95% всех клеточных элементов и имели жизнеспособность не менее 92–97%. У каждого больного набирали по 50–80 мл БАС, часть которого использовали для определения процентного содержания и жизнеспособности легочных макрофагов (ЛМ). Остальной материал разливали по двум пробиркам: одну использовали в качестве исходного контроля (I группа), в другую добавляли 0,5 мл инфосурфа (II группа). Для этого 35 мг каждого препарата разводили в 5 мл стерильного физиологического раствора ($t = 37^\circ\text{C}$).

В течение экспозиции, которая во всех случаях составляла 45 мин, пробирки с клетками встряхивали каждые 10 мин. Затем их центрифугировали 8 мин при 1500 об./мин, надосадочную жидкость сливали, а клеточный осадок в течение 60 мин фиксировали 2,5%-ным раствором глутарового альдегида на какодилатном буфере (рН 7,2–7,4), дофисировали 40 мин 1%-ным OsO_4 и заключали в эпоксидную смолу известным способом.

Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе.

Как показало электронно-микроскопическое исследование, среди макрофагов БАС пациентов с БЭБ в стадии обострения 44–53% составляют крупные клетки (35–50 мкм в диаметре) с ультраструктурными признаками активной фагоцитарной функции.

Значительная часть легочных мононуклеаров имеет развитую ультраструктурную организацию, содержит первичные и вторичные лизосомы, количество которых варьирует в разных клетках. В цитоплазме фагоцитов определяются одна, реже две фагосомные вакуоли и 2–6 полностью сформированных. В их составе чаще всего можно видеть осмиофильный пластинчатый материал фосфолипидной природы или фрагменты разрушенных клеточных элементов, главным образом лейкоцитов.

Характерно, что в I группе наблюдения мембранный материал сурфактанта в цитоплазме ЛМ обнаруживается достаточно редко. Чаще можно наблюдать мелкие фрагменты тубулярного миелина и его одиночные мембраны, лежащие среди клеток БАС свободно или рядом с поверхностью ЛМ. При этом активации плазмалеммы макрофага, т. е. формирования цитоплазматических выростов и инвагинаций обычно не наблюдается (рис. 1).

Более активная эктоплазма у ЛМ с признаками фагоцитоза клеточного детрита. В ряде случаев мы наблюдали картину непосредственного захвата фрагментов разрушенных клеток и их мембранных структур длинными псевдоподиями, окружающими объект фагоцитоза.

Этот же материал можно было видеть в составе нескольких фагосомных вакуолей (рис. 2).

Иная картина отмечается в популяции макрофагов после инкубации с экзогенным сурфактантом. Как показало электронно-микроскопическое исследование, во II группе наблюдений их до 78%.

Помимо уже отмеченных особенностей фагоцитоза, характерных для группы I, значительная часть макрофагов во II группе отличалась увеличенным количеством фагосомных вакуолей, содержащих кольцевидные мембраны экзогенного сурфактанта. Этот же материал можно было видеть свободно лежащим между ЛМ, а также в тесном контакте с их поверхностью. Такие фагоциты отличались обилием микровыростов и псевдоподий, частично или полностью окружающих структуры сурфактанта (рис. 3).

Необходимо также отметить некоторую активацию фагоцитарной функции у молодых мононуклеаров, которые наращивают свой лизосомальный потенциал. Обычно они не содержат фагосом и вторичных лизосом, но имеют все признаки активного синтеза лизосомальных ферментов.

В нашем исследовании биосинтезирующие макрофаги во всех группах наблюдений составляли не менее 30–40% всех макрофагальных элементов и имели характерную ультраструктурную организацию ядра и цитоплазмы: крупное ядрышко, выраженный конденсированный хроматин, хорошо развитые профили гранулярной цитоплазматической сети и пластинчатого комплекса, большое количество свободных рибосом и полисом в цитоплазме. После инкубации с экзогенным сурфактантом во многих биосинтезирующих макрофагах выявляли по 2–5 крупных фагосомных вакуолей и фагосомы, содержащие осмиофильный пластинчатый материал. Можно было наблюдать многочисленные разновеликие псевдоподии, направленные макрофагом в сторону рядом расположенных мембран экзогенного сурфактанта (рис. 4).

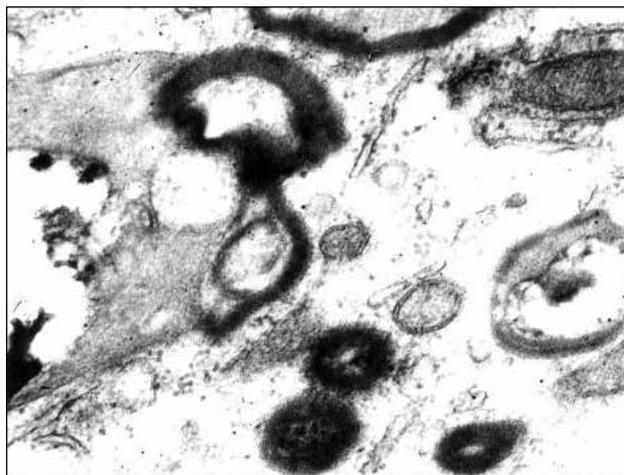


Рис. 1. Ультраструктурные особенности альвеолярных макрофагов бронхоальвеолярного смыва. Отмечается фрагмент цитоплазмы с большим количеством фагосом и структуры тубулярного миелина рядом с поверхностью альвеолярного макрофага, $\times 37\,000$

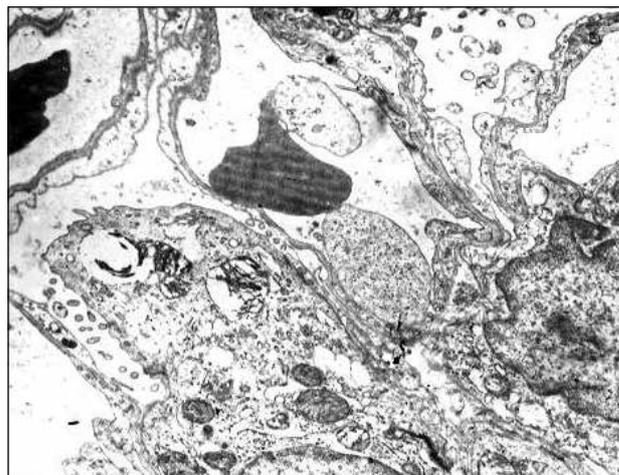


Рис. 2. Захват клеточного детрита альвеолярными макрофагами. Представлены сформированные фагосомы в цитоплазме альвеолярного макрофага, $\times 3800$

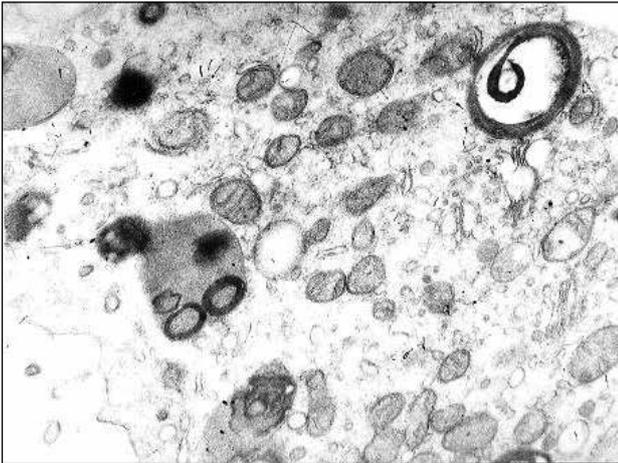


Рис. 3. Наличие экзогенного сурфактанта внутри фагосом альвеолярного макрофага, $\times 32\ 000$

Другая характерная особенность популяции легочных макрофагов, инкубированных с препаратами сурфактанта, — выявление среди фагоцитирующих макрофагов крупных клеток с хорошо развитой структурой цитоплазмы, особенно элементов пластинчатого комплекса. Последние обнаруживаются не только в околядерной зоне, как у большинства фагоцитов, а по всей площади цитоплазмы (рис. 5). Она содержит большое число полирибосом и митохондрий, что очевидно указывает на активацию в клетках процессов биосинтеза и повышение протеолитической способности зрелых фагоцитов.

Таким образом, введение препаратов сурфактанта в материал БАС вызывает активацию клеточной поверхности легочных макрофагов, о чем свидетельствует появление многочисленных микровыростов и псевдоподий. Последние направлены к расположенным рядом мембранам экзогенного сурфактанта. Можно наблюдать раз-

личные стадии формирования фагосомных вакуолей, включающих аналогичный материал.

Характерно, что поглощение экзогенного сурфактанта наблюдается не только у зрелых макрофагов, но и молодых биосинтезирующих макрофагов, которые в контрольной группе наблюдения обычно не проявляют какой-либо фагоцитарной активности. Индукция процессов поглощения, очевидно, сопровождается активацией лизосомального аппарата фагоцитов, что также указывает на стимулирующий эффект препаратов сурфактанта на фагоцитарную функцию ЛМ.

Результаты проведенных исследований показали, что препараты сурфактанта оказывают непосредственное активирующее влияние на макрофагальные элементы легких, что отчетливо прослеживается в экспериментах *in vitro*. Как показало электронно-микроскопическое исследование макрофагальных элементов БАС пациентов с БЭБ в стадии обострения, после инкубации клеток с курсурфом наблюдается выраженная картина активации клеточной поверхности, формирования фагоцитарных вакуолей, содержащих мембраны экзогенного сурфактанта. Его мелкие и более крупные скопления часто выявлялись свободно лежащими между ЛМ, тогда как в группе контроля отмечены мелкие фрагменты тубулярного миелина или осмиофильных пластинчатых телец. Следовательно, специфическое фармакологическое действие препаратов сурфактанта оказывает прямое влияние на процессы дифференцировки и созревания ЛМ, активации их фагоцитарной функции.

Полученные данные исследования *in vitro*, свидетельствующие о стимулирующем действии препаратов сурфактанта на ЛМ, определяют перспективность применения эндобронхиального введения данной группы препаратов у больных БЭБ.

www.imj.kh.ua

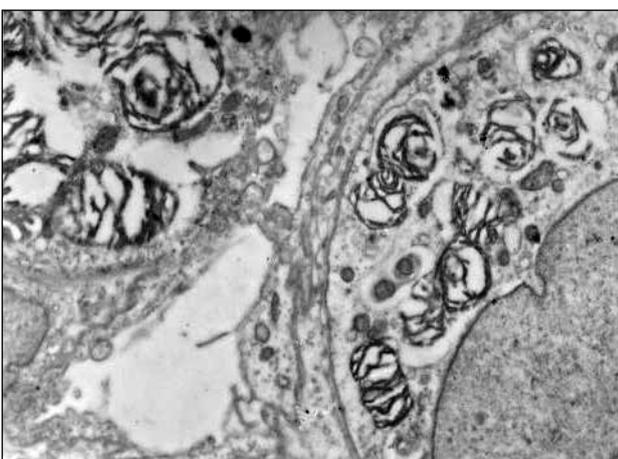


Рис. 4. Биосинтезирующий макрофаг бронхоальвеолярного смыва больных, получавших терапию экзогенным сурфактантом, $\times 43\ 000$

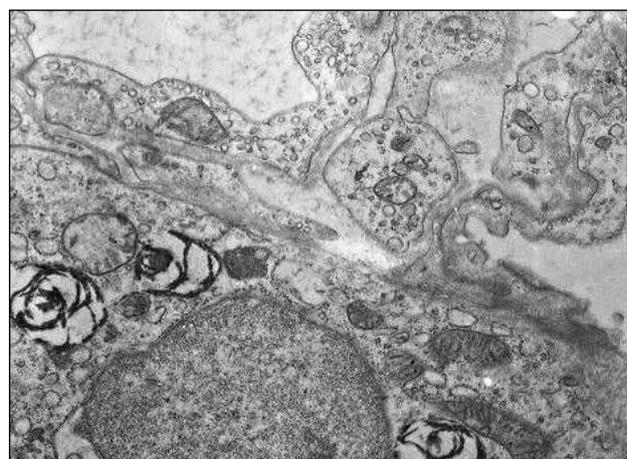


Рис. 5. Фагоцитирующий макрофаг бронхоальвеолярного смыва больных, получавших терапию экзогенным сурфактантом, $\times 26\ 000$

Список литературы

1. Куртуков В. А. Местное воздействие на воспаление в слизистой оболочке бронхов при обострении хронических обструктивных болезней легких и бронхоэктазиях / В. А. Куртуков // Проблемы клинической медицины.— 2006.— № 4.— С. 71–77.
2. Шойхет Я. Н. Лечение больных с обострением хронической обструктивной болезни легких и бронхоэктатической болезни путем местного воздействия на воспаление в слизистой оболочке бронха / Я. Н. Шойхет // Проблемы клинической медицины.— 2006.— № 4.— С. 70–77.
3. Мейер К. С. Использование бронхоальвеолярного лаважа в диагностике интерстициальных заболеваний легких: клинические рекомендации Американского торакального общества / К. С. Мейер, Дж. Рэгх, Р. Баугман // Пульмонология.— 2012.— № 4.— С. 17–27.
4. Свирская О. Я. Влияние тяжести асфиксии на эффективность сурфактантной терапии болезни гиалиновых мембран у недоношенных новорожденных / О. Я. Свирская, Ю. А. Устинович // Мед. панорама.— 2012.— № 2.— С. 51–53.
5. Технология введения сурфактантсодержащих лекарственных средств недоношенным детям с респираторным дистресс-синдромом: инструкция по применению № 075–071, утвержд. МЗ Республики Беларусь 05.11.2011 / К. У. Вильчук, О. Я. Свирская, Т. В. Гнедко.— Минск: ГУ РНПЦ «Мать и дитя», 2012.— 8 с.
6. Устинович Ю. А. Влияние сверххранной сурфактантной терапии на выживаемость недоношенных новорожденных / Ю. А. Устинович, О. Я. Свирская // Здравоохранение.— 2010.— № 8.— С. 60–63.
7. Филиппов В. П. Бронхоальвеолярный лаваж при диффузных поражениях легких / В. П. Филиппов.— М.: Медицина, 2006.— 80 с.

ВИВЧЕННЯ АКТИВУЮЧОГО ВПЛИВУ ПРЕПАРАТІВ СУРФАКТАНТУ НА ЛЕГЕНЕВІ МАКРОФАГИ IN VITRO У ПАЦІЄНТІВ ІЗ БРОНХОЕКТАТИЧНОЮ ХВОРОБОЮ

В. В. БОЙКО, П. І. КОРЖ, В. В. МАКАРОВ, Д. В. МІНУХІН

Вивчено активуючий вплив препаратів сурфактанту на легеневі макрофаги in vitro у пацієнтів із бронхоектатичною хворобою у стадії загострення. Результати електронно-мікроскопічного дослідження макрофагальних елементів бронхоальвеолярного змиву у хворих свідчать про те, що після інкубації клітин із курсурфом з'являється виражена картина активації клітинної поверхні, формування фагоцитарних вакуолей, які містять мембрани екзогенного сурфактанту.

Ключові слова: бронхоектатична хвороба, сурфактант, легеневі макрофаги.

STUDY OF ACTIVATING EFFECT OF SURFACTANT DRUGS ON PULMONARY MACROPHAGES IN VITRO IN PATIENTS WITH BRONCHIECTASIS

V. V. BOIKO, P. I. KORZH, V. V. MAKAROV, D. V. MINUKHIN

The activating effect of surfactant preparations on pulmonary macrophages in vitro in patients with acute bronchiectasis has been studied. The results of electron microscopic examination of the macrophage elements of bronchoalveolar lavage in patients have shown that after incubation of cells with Curosurf there have been a pronounced activation of a cell surface, formation of phagocytic vacuoles containing membranes of exogenous surfactant.

Key words: bronchiectasis, surfactant, pulmonary macrophages.

Поступила 25.06.2019