

3. Касаткина Э. П., Шилин Д. Е. Радиационная патология щитовидной железы у детей и подростков. Лекция 1. Эффект малых доз облучения и концепция риска отдаленных последствий Чернобыльской катастрофы // Пробл. эндокринологии. - 1997. - Т. 43, № 4. - С. 24 - 30.

УДК 616.24-002.182-008.9-07

А.Д. Таганович*, В.Г. Цыганков, Л.И. Котович *, Г.Н. Семенкова *

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ, КОМПОНЕНТЫ СУРФАКТАНТА ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Саркоидоз – системное заболевание, которое в последние годы интенсивно распространяется на территории Беларуси. Хотя причины саркоидоза до сих пор не установлены, одной из наиболее вероятных теорий его развития является так называемая "средовая" гипотеза. Она основывается на наблюдениях кластерных случаев заболевания саркоидозом среди медицинских сестер, пожарных, при длительном воздействии на организм металлической пыли и органических антигенов [1].

Иммунологические исследования клеток бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) несколько улучшили понимание характера изменений в легких при данной патологии [2,3,4]. В частности, накопленные данные позволяют предположить, что продукт секреции альвеолярных макрофагов (АМ) - фактор некроза опухолей- α (ФНО- α) играет ключевую роль в возникновении воспалительных изменений при саркоидозе и, возможно, является определяющим для прогрессирования заболевания [5]. Известно, что одним из критериев функциональной активности мононуклеарных фагоцитов является их способность генерировать активные формы кислорода (АФК) [9]. Причем АФК в фагоцитах проявляются не только как цитотоксические агенты, но и выполняют роль вторичных мессенджеров в процессах трансдукции активационного сигнала через плазматическую мембрану внутрь клетки [10]. Поэтому нарушения в работе кислородактивирующих систем макрофагов могут повлечь за собой изменения в ряде других метаболических реакций в этих клетках. Другим компонентом бронхоальвеолярного смыва (БАС) является сурфактант легких. Он обеспечивает стабилизацию альвеол в процессе дыхания, участвует в регуляции иммунного ответа и может быть причастен к механизмам возникновения и поддержания воспалительного процесса при саркоидозе [6, 7, 8]. Задачей нашего исследования стало

* Минский государственный медицинский институт

изучение функциональной активности АМ и компонентов сурфактанта легких у больных саркоидозом органов дыхания. Анализировались содержание ФЛ и общего белка в БАС, клеточный состав и секреция АМ ФНО- α , способность альвеолярных макрофагов и (для сравнения) моноцитов крови больных генерировать активные формы кислорода (АФК) до и после терапии при воздействиях, стимулирующих их метаболизм.

Материалы и методы исследования

Обследовано 54 больных саркоидозом органов дыхания в возрасте от 18 до 49 лет (31 мужчина и 23 женщины). Саркоидоз I ст. (медиастинальная форма) диагностировали у 27 больных (из них 12 курящих), у 27 пациентов (6 курящих) был саркоидоз II/III ст. (легочно-медиастинальная и легочная формы заболевания). 6 больных (саркоидоз I ст., $n=2$; саркоидоз II/III ст., $n=4$), были обследованы дважды - до лечения и по окончании курса терапии, включавшей в себя витамины, иммуномодулирующие, противовоспалительные средства и амброксол. Кортикостероидные препараты не применялись. Контрольная группа состояла из 9 добровольцев, не имеющих жалоб и клинических проявлений острых либо хронических легочных заболеваний.

БАЛ проводили по стандартной методике, разработанной ЦНИИТ МЗ СССР. Полученный смыв фильтровали для удаления слизи и центрифугировали. Супернатант концентрировали. Экстракцию липидов проводили по Folch, а разделение фосфолипидов (ФЛ) - методом тонкослойной хроматографии. Количественный учет ФЛ вели по содержанию липидного фосфора. Концентрацию белка определяли методом Lowry.

Альвеолярные макрофаги выделяли из смеси клеток БАС путем прилипания их к пластиковой поверхности чашек Петри и затем культивировали в течение 24ч. В культуральной жидкости определяли ФНО- α . Для этого использовали твердофазный "сэндвич"-вариант иммуоферментного анализа. Моноциты выделяли из крови в градиенте плотности фиколл-верографина по методу, описанному в работе [11]. Полученную смесь мононуклеарных клеток разделяли инкубированием в течение одного часа при температуре 37°C в пластиковых чашках Петри. Прилипшие к пластику моноциты снимали с поверхности чашки с помощью скрэпера, отмывали и переводили в среду Эрла. Генерацию АФК изучали методом люминолзависимой хемиллюминесценции (ЛЗХЛ) на биохемиллюминетре БХЛ-1. Клетки стимулировали латексом и фитогемагглютинином (ФГА).

Результаты исследования и обсуждение

Общее количество клеток БАЛЖ во всех исследуемых группах было примерно одинаковым - $2,4 \pm 0,3 \cdot 10^5$ /мл. Жизнеспособность альвеолярных макрофагов составляла 70-

95%. У больных саркоидозом II/III ст. отмечался выраженный лимфоцитоз в БАЛЖ ($p < 0,05$), тенденция к увеличению содержания лимфоцитов наблюдалась и у больных саркоидозом I ст. Результаты проведенных исследований показали, что у больных саркоидозом органов дыхания имеются значительные функциональные изменения со стороны сурфактантной системы легких. Концентрация общего белка в БАС больных ($376,0 \pm 78,6$ мг/мл) была существенно выше ($P < 0,05$), чем в контрольной группе ($113,3 \pm 7,3$ мг/мл). Преобладающая фракция ФЛ во всех исследуемых группах была представлена фосфатидилхолином (ФХ), более 70% которого составлял динасыщенный фосфатидилхолин (ДНФХ). Это свидетельствует о принадлежности выделенных ФЛ к сурфактанту легких. У больных саркоидозом в БАС наблюдалось статистически достоверное уменьшение содержания общего липидного фосфора ($37,3 \pm 4,7$ мкмоль липидного фосфора/л) и основных сурфактантных фракций ФЛ: ФХ ($24,8 \pm 3,0$), ДНФХ ($18,9 \pm 2,5$) и фосфатидилэтаноламина ($6,3 \pm 0,9$) по сравнению с контрольной группой ($68,5 \pm 9,8$; $49,9 \pm 7,9$; $37,3 \pm 7,1$ и $13,3 \pm 2,0$ мкмоль Р/л соответственно). Относительное содержание СМ было существенно выше контрольного уровня ($3,9 \pm 1,1\%$) и составляло $9,5 \pm 0,8\%$.

Обнаруженные нарушения могут быть связаны с гипоксией и снижением функциональной активности альвеолоцитов II типа (А-II) - клеток, ответственных за синтез и секрецию основных компонентов сурфактанта, - за счет отека и набухания основного вещества соединительной ткани, утолщения аэрогематического барьера, нарушений микроциркуляции, сопровождающих воспалительный процесс в альвеолах.

Обнаружено, что АМ больных саркоидозом I ст. ($8,186 \pm 1,321$ нг/мл/ 10^6 клеток) и II/III ст. ($7,715 \pm 1,335$) продуцируют ФНО- α в значительно больших количествах ($P < 0,05$), чем в контроле ($3,847 \pm 1,392$). Известно, что ФНО- α является одним из основных медиаторов воспалительных реакций. При саркоидозе усиленная продукция АМ данного цитокина приводит к активированию и пролиферации Т-лимфоцитов, а также стимуляции выработки клетками других противовоспалительных факторов.

После лечения у 4 из 6 обследованных пациентов наблюдалось увеличение секреции ФНО- α АМ по сравнению с состоянием до лечения. У всех пациентов в результате проведенной медикаментозной терапии повысилось содержание фосфолипидного компонента в БАС. Клинически у всех больных наблюдалось улучшение состояния, что выражалось в отсутствии жалоб и появлении рентгенологических признаков рассасывания инфильтратов в легких и лимфатических узлах.

До лечения альвеолярные макрофаги больных саркоидозом либо не генерируют, либо генерируют образование небольших количеств АФК при стимуляции частицами латекса и

ФГА. Для моноцитов крови этих же больных зарегистрирован слабый уровень образования АФК при адгезии клеток на стекло и добавлении к ним изучаемых стимуляторов. После курса терапии с применением амброксола наблюдалось значительное увеличение скорости образования АФК как в альвеолярных макрофагах, так и в моноцитах крови пациентов. Следует заметить, что выход АФК при стимуляции метаболизма в изучаемых клетках пациентов после терапии не превышал соответствующий показатель, полученный при исследовании суспензий макрофагов и моноцитов здоровых доноров. Отмеченные для пациентов результаты коррелируют с данными клинических наблюдений: после лечения у больных наблюдали рассасывание легочных инфильтратов.

Поскольку в курсе терапии саркоидоза использовали амброксол, представляло интерес исследование влияния этого препарата *in vitro* на процессы генерации АФК мононуклеарными клетками. Введение амброксола в суспензию моноцитов приводило к значительному ингибированию ЛЗХЛ и изменению формы кинетических кривых. Это может быть связано, во-первых, с тушением ЛЗХЛ, так как амброксол содержит аминогруппы и может быть перехватчиком гидроксильных радикалов и синглетного кислорода. Во-вторых, амброксол способен влиять на процессы образования АФК посредством модифицирования редокс-систем моноцитов. В литературе существуют противоречивые данные о влиянии амброксола на генерацию АФК фагоцитами [12,13]. Увеличение кислородактивирующей способности изучаемых клеток после терапии с применением амброксола скорее свидетельствует в пользу модифицирующего (либо иммуномодулирующего действия) этого препарата на моноциты.

Тот факт, что значения выхода активных форм кислорода при стимулирующих воздействиях на альвеолярные макрофаги и моноциты крови, полученные до начала, в ходе терапии пациентов и у здоровых доноров, коррелируют между собой, можно интерпретировать следующим образом. Уменьшение выхода АФК в мононуклеарных фагоцитах при саркоидозе свидетельствует о снижении функциональной активности исследуемых клеток. Поскольку моноциты крови рассматриваются в качестве предшественников альвеолярных макрофагов, можно предположить, что изменения в функционировании кислородактивирующих систем альвеолярных макрофагов при развитии саркоидоза происходят на уровне клеток-предшественников.

Проведенное исследование позволяет прийти к заключению о том, что при саркоидозе органов дыхания в БАС значительно увеличивается концентрация белка, а также происходят изменения компонентов сурфактантной системы легких, что выражается в уменьшении содержания общих фосфолипидов и основных сурфактантных фракций. При этом заболевании изменяется клеточный состав БАЛЖ. У больных саркоидозом II/III ст. имеет

место выраженный лимфоцитоз. Вместе с тем страдает функциональная способность альвеолярных макрофагов. Они продуцируют повышенное количество ФНО- α . При этом степень повышения не зависит от стадии заболевания.

Проведение патогенетической терапии улучшает клиническое состояние больных, обмен сурфактанта в легких, но не снижает продукцию макрофагами ФНО- α . Первый опыт использования амброксола - препарата, стимулирующего синтез сурфактанта в легких, показал перспективность его для лечения больных саркоидозом. В этом плане заслуживает внимание оценка его в качестве эффективного заменителя гормональной терапии. Из полученных данных следует, что определение кислородактивирующей способности альвеолярных макрофагов и моноцитов может быть информативным при проведении комплексной диагностики и оценки эффективности лечения саркоидоза органов дыхания.

Учитывая тот факт, что забор бронхоальвеолярного лаважа - достаточно сложная для пациента процедура, можно рекомендовать использовать для контроля за ходом лечения вместо клеток легких моноциты крови.

Литература

1. Newman L. S., Rose C.S., Maier L.A. //The New Engl. J. Med..- 1997 -v.336(17).-pp.1224-1234.
2. Kelso Anne //Immunology and Cell Biology.-1998 -v.78 -pp.300-317.
3. Prior C., Knight R.A., Herold M. et al. // Eur.Resp.J. - 1996 -v.9 -pp.47-53.
4. Zissel Gernot, Jiri Homolka, Jorg Schlaak et al. // Am.J.Respir.Crit.Care Med. -1996- v.154 - pp.713-719.
5. Ziegenhagen Manfred W., Benner Udo K., Zissel Gernot et al. // Am.J.Respir.Crit.Care Med. - 1997- v.156 - pp.1586-1592
6. Griese M. //Eur. Resp. J.- v.13- pp.1455-1476.
7. Wilsher ML, Huges DA, Haslam PL. //Thorax.- 1988- v.43- №5- p. 354-359.
8. Zetterberg G, Curstedt T, Eklund A. //Sarcoidosis.- 1995- v.12- №1- p. 46-50
9. Semenкова G.N., Smirnova E.N., Kovalenko E.I., Gerein V., Savanovich I.I., Cherenkevich S.N. // Exp. Oncol. - 1997. - №2, V.19. - P. 153-156
10. Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н.// Фотобиология и мембранная биофизика. Под ред. И.Д. Вологовского, Мн.: "Технопринт", 1999, С. 209 - 220.
11. Бейум А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов.- М.: Мир. -1984.- 496с.
12. Teramoto S., Suzuki M., Matsure T., Ouchi Y.// Jap. J. Pharmac. - 1998. - V. 78., №4. - P. 429 - 434.
13. Nawroska A., Papierz W. // Pulmon. Pharmac. Therap.- 1999. - V.12,№ 6. - P. 369 - 375.