

Л.К.Романова

БИОЛОГИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЛЕГКИХ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* АЛЬВЕОЛОЦИТОВ 2-ГО ТИПА

II. Морфофункциональные особенности изолированных альвеолоцитов 2-го типа*

НИИ морфологии человека РАМН, Москва

Степень морфофункциональной полноценности альвеолоцитов 2-го типа, выделенных из легких, устанавливается с учетом нескольких критериев, которые основаны на определении проницаемости плазматической мембраны, уровня поглощения кислорода, а также измерении дыхательной функции митохондрий.

Выделенные из легких АК-2 содержат сравнительно высокие концентрации некоторых цитоплазматических ферментов, например лактатдегидрогеназы. За 1 ч инкубации в среде из $1 \cdot 10^6$ АК-2, полученных из легких взрослых крыс, в культуральную среду выходит до 5,7% лактатдегидрогеназы, т.е. почти такое же количество, какое обнаружено в среде, содержащей альвеолярные макрофаги (АМ) и лейкоциты БАС, не подвергавшейся действию протеаз [18]. Это указывает на функциональную полноценность внутриклеточных структур, в частности цитоплазматической сети и рибосом, ответственных за синтез белков.

В свежих изолированных АК-2 выявляется высокая активность щелочной фосфатазы, умеренная активность кислой фосфатазы в области цитофосфолипосом и слабая или отсутствие активности галактозидазы [8,9]. Такая гистохимическая характеристика изолированных АК-2 сходна с таковой для альвеолоцитов 2-го типа, входящих в состав альвеолярной выстилки интактных легких [8].

Белок распределяется по фракциям органелл изолированных АК-2 таких же образом, как и в аналогичных фракциях легочного гомогената. В изолированных АК-2 взрослых крыс Спрейг-Доули выявлен рецептор к аллопротеину сурфактанта (SP-A) при помощи изотопа ^{125}I -SP-A [16].

Активность ферментов, причастных к биосинтезу фосфолипидов, выявлена в фракции цитоплазматической сети изолированных АК-2. Это глицерол-3-фосфатацилтрансфераза и холинфосфотрансфераза. Активность этих ферментов в фракции цитоплазматической сети из АК-2 в 2–4 раза выше, чем в аналогичных фракциях из АМ [7].

Уровень ферментов, участвующих в синтезе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) *de novo*, в изолированных АК-2 из легких взрослых крыс очень высок [7]. Специфическая активность холинкиназы,

холинфосфотрансферазы и лизолецитинацилтрансферазы в АК-2 почти в 10 раз выше, чем в гомогенате из тканей целых легких.

Только что выделенные АК-2 из легких взрослого кролика содержат 113 мг белка и 1,18 мг фосфора фосфолипидов на $1 \cdot 10^6$ клеток [18,21].

Фосфолипидный состав АК-2 легких взрослых животных представлен в таблице; он отражает функциональное состояние этих клеток в момент их выделения из органа. Изолированные АК-2 содержат больше фосфолипидов, чем АМ БАС, полученные от тех же животных. Значительные различия между этими клетками проявляются и в их фосфолипидном составе. В изолированных АК-2 легких как крыс, так и кроликов преобладает фосфатидилхолин — ФХ (лецитин), на долю которого приходится более 40–50% всех фосфолипидов [12,21].

В фракции ФХ из АК-2, выделенных из легких взрослых кроликов, содержится 31,9%, а в АМ — 19,8% ДПФХ [18]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что каждая АК-2 содержит почти вдвое больше ДПФХ, чем АМ. Если учесть, что объем АМ почти в 2–3 раза больше, чем объем АК-2, то концентрация ДПФХ в одном альвеолоците 2-го типа почти в 6 раз больше, чем в одном АМ [15,18]. Несмотря на то что наличие ДПФХ не специфично для АК-2, так как он входит в состав всех клеточных мембран и содержится в АМ, этот фосфолипид обнаружен в АК-2 в значительно больших концентрациях. Уникальность ФХ и ДПФХ легочного сурфактанта *in vivo* и изолированных АК-2 заключается в их богатстве насыщенными жирными кислотами. В связи с этим многие исследователи считают, что ДПФХ может служить биохимическим маркером изолированных АК-2.

Помимо ФХ в клетках, как и в составе сурфактанта *in vivo*, имеются и другие фосфолипиды, представленные в различном количественном выражении. Так, на долю фосфатидилэтаноламина приходится 12–18% от всех фосфолипидов. Содержание фосфатидилглицерина и сфингомелина не превышает 10–15%, однако колеблется, согласно данным разных авторов, в значительных пределах. Фосфолипиды изолированных АК-2 из легких взрослых кроликов включают так-

* Романова Л.К. Биология изолированных из легких и культивируемых *in vitro* альвеолоцитов 2-го типа (I. Методы получения и идентификации изолированных альвеолоцитов 2-го типа — опубликовано в журнале "Пульмонология", 2000, №3).

же фосфатидилинозитол (3,1%), фосфатидилсерин (1,9%), кардиолипин (3,7%), лизофосфатидилхолин (0,4%). На долю других неидентифицированных фракций фосфолипидов приходится до 1,1% [7].

Таким образом, АК-2, выделенные из легких и подвергавшиеся действию протеаз, сохраняют свою ферментативную активность. Более того, в них проявляется специфическая активность ферментов, участвующих в синтезе фосфолипидов, в частности в синтезе ДПФХ. Высокая активность ферментов фосфолипидного синтеза свидетельствует о функциональной полноценности изолированных АК-2. Состояние изолированных АК-2 во многом отражает биохимический статус альвеолоцитов 2-го типа легких *in vivo*. Этот вывод чрезвычайно важен, так как он позволяет использовать изолированные АК-2 в качестве модельной системы для изучения метаболизма и синтетических процессов в легких в обычных физиологических условиях, а также при различных экспериментальных воздействиях и легочной патологии.

Метаболические и функциональные возможности альвеолоцитов 2-го типа, изолированных из легких

Суспензия АК-2, выделенных из легких взрослых крыс Спрейг-Доули, поглощает $46,9 \pm 5,8$ нмоль кислорода в час на $1 \cdot 10^6$ клеток в условиях отсутствия какого-либо субстрата [9]. Наряду с этим при помощи полярографии показано, что изолированные АК-2 из легких взрослых крыс Лонг-Эванс и Спрейг-Доули,

лишенных патогенной флоры, утилизируют 101 ± 21 нмоль/ч кислорода на $1 \cdot 10^6$ клеток [11]. При добавлении в инкубационную среду 10 мМ сукцината натрия поглощение кислорода возрастает только на 10% [11]. Поэтому полагают, что клетки могут быть непроницаемы для сукцината натрия. Известно, что сукцинат натрия прекрасный субстрат для изолированных митохондрий; он стимулирует процессы дыхания. Если предположить, что сукцинат натрия не проникает через плазматическую мембрану АК-2, то можно думать о ее хорошей сохранности, несмотря на обработку протеазами. Изолированные АК-2 из легких взрослых кроликов поглощают 76 ± 12 нмоль/ч кислорода на $1 \cdot 10^6$ клеток спустя 1–2 ч инкубации [18].

Добавление в среду, где находятся АК-2, глюкозы мало изменяет степень поглощения кислорода, однако в присутствии сукцината натрия этот процесс активируется и показатель утилизации кислорода может увеличиваться до 20–30%. Введение в инкубационную среду актиномицина А — ингибитора дыхания митохондрий полностью прекращает дыхание и поглощение кислорода, а в присутствии олигомицина утилизация кислорода клетками сокращается на 50%. Если после подавления дыхания в среду добавить восстановители окислительного фосфорилирования, то АК-2 опять начинают поглощать кислород. Эти результаты указывают на функциональную полноценность митохондриального аппарата изолированных АК-2. Интенсивность утилизации кислорода изолированными АК-2 зависит, по-видимому, от метода выделения клеток, степени их жизнеспособности,

Таблица

Фосфолипидный состав изолированных альвеолоцитов 2-го типа легких взрослых животных

Фракция фосфолипидов	Содержание по отношению к суммарным фосфолипидам, %			
	крысы		кролики	
	[15]	[15]	[11]	[7]
Общие фосфолипиды	***	100,0	100,0	100,0
Фосфатидилхолин	67,0±3,0	48,2±2,3	71,8	66,7
Фосфатидилэтаноламин	14,3±4,0	18,7±1,1	12,6	13,5
Фосфатидилглицерин	9,0±3,0	*	10,3	3,5
Фосфатидилинозитол	1,7±0,6	*	0,5	3,1
Фосфатилсерин	3,0±1,7	*	*	1,9
Сфингомиелин	3,0±1,0	15,4±5,3	1,2	6,1
Кардиолипин	*	*	*	3,7
Лизофосфатидилхолин	*	*	0,3**	0,4
Другие фракции	2,0±1,0	17,7±6,6	3,0	1,1

Примечание. * — содержание фракции не указано, ** — содержание лизофосфатидилхолина вместе с фосфатидилсерином, *** — содержание общих фосфолипидов — $52,9$ нмоль на 10^6 клеток.

чистоты клеточной фракции, а также условий ферментативной обработки легких. В связи с этим уровень поглощения кислорода может служить не только показателем метаболической активности клеток, но и критерием их жизнеспособности.

Инкубация изолированных АК-2 в присутствии ^{14}C -глюкозы выявила способность клеток продуцировать лактат, пируват и выделять $^{14}\text{CO}_2$ в линейно возрастающих количествах с увеличением времени инкубации [9,18]. Следовательно, внутри АК-2 происходит транспорт глюкозы, превращение ее в лактат и пируват, а также окисление до CO_2 . Сравнительно низкий показатель соотношения лактата к пирувату указывает, по мнению авторов, на нормальное метаболическое состояние клеток. Сравнительное исследование метаболизма АК-2 и АМ показало, что АК-2 включают меньше глюкозы и продуцируют меньше лактата, чем АМ.

Изолированные АК-2 из легких взрослых крыс включают ^{35}S -метионин [26], а также ^{14}C -лейцин [11]. Появление предшественников белкового синтеза в АК-2 свидетельствует о функциональной сохранности цитоплазматической сети и цитоплазматических источников энергии.

В легочном сурфактанте преобладают фосфолипиды. Причем ДПФХ наиболее поверхностно-активный компонент. Изолированные АК-2 из легких взрослых животных содержат высокие концентрации ФХ (3,0 мкг Р на 1 мг белка), из которого более 50% приходится на долю ДПФХ.

Наряду с этим в ряде исследований была выявлена прямая корреляция между числом цитофосфолипосом (осмофильных пластинчатых телец) в альвеолоцитах 2-го типа и наличием поверхностно-активного ФХ. При помощи автордиографии было показано, что меченая пальмитиновая кислота концентрируется в АК-2 легких. Таким образом, существовало косвенное подтверждение того, что АК-2 активно синтезируют фосфолипиды легочного сурфактанта. Однако отсутствовали прямые доказательства связи между синтезом поверхностно-активных веществ сурфактанта и функцией АК-2.

Известно, что *in vivo* альвеолоциты 2-го типа включают меченые предшественники синтеза ФХ. Возник вопрос, продолжается ли синтез фосфолипидов в АК-2 после того, как они были изолированы из легких и помещены в культуральную среду. Для того чтобы ответить на этот вопрос, были проведены специальные работы [11,35]. Взрослым сирийским хомякам внутривенно однократно вводили ^{14}C -пальмитиновую кислоту. Через 4 ч после импульсной метки из легких выделяли АК-2. Было обнаружено, что клетки содержат сравнительно высокие концентрации меченой пальмитиновой кислоты, что указывало на быструю метаболизацию предшественников синтеза фосфолипидов в этих клетках.

Изолированные АК-2 легких взрослых кроликов инкубировали в течение часа с различными предшественниками синтеза ФХ и определяли радиоактив-

ную метку в клеточной фракции и инкубационной среде [15]. Оказалось, что АК-2 активно включают ^{14}C -холин и ^{14}C -этанолламин. Знаменательно, что в 50% меченого холина обнаружено в составе ФХ, а 35% — в ДПФХ.

Меченый этаноламин выявлен только в фракции фосфатидилэтаноламина, а меченые метионин и глицерин включались в ФХ АК-2 в небольших количествах. Эти данные позволили прийти к выводу, что изолированные АК-2 способны синтезировать ДПФХ — основной компонент легочного сурфактанта. При этом синтез ДПФХ осуществляется главным образом через цитидиндифосфохолиновый путь. Сравнительно незначительное включение ^{14}C -этанолламина и метиловых групп ^{14}C -метионина в ФХ АК-2 указывает на относительно небольшой вклад трансметилирования в синтез внутриклеточного лецитина [15].

Впервые [24] было показано, что ^{14}C -пальмитиновая кислота активно включается не только в ФХ, но и в фосфатидилглицерин (ФГ) АК-2 как *in vivo*, так и *in vitro*. Эти данные позволили предположить, что синтез ФГ является одной из важных метаболических функций АК-2. В последующих исследованиях было установлено, что действительно в ФГ АК-2 включается больше ^{14}C -пальмитата, чем во все остальные фракции фосфолипидов, исключая ФХ. В ФГ АМ включается в 35 раз меньше меченого пальмитата, чем в ФГ альвеолоцитов 2-го типа [24].

Наряду с активным поглощением меченых предшественников синтеза фосфолипидов АК-2 наблюдалось повышение концентрации меченого ДПФХ в инкубационной среде, где находились клетки. Это служило прямым доказательством выделения (секреции) АК-2 поверхностно-активного материала легочного сурфактанта.

Установлено, что изолированные АК-2 включают и другие меченые предшественники синтеза фосфолипидов: ^{14}C -ацетат, ^{14}C -глицерин, ^{14}C -олеат, ^{14}C -линолеат [15,18,24]; 49% ^{14}C -ацетата включается в ФХ изолированных АК-2, который содержит 78% метки в ДПФХ. Скорость включения меченого ацетата в ФХ $3,9 \text{ нмоль}/10^6 \text{ клеток}/\text{ч}$ при концентрации предшественника в культуральной среде 1 мМ.

Преимущественно в ФХ включается также ^{14}C -пальмитат (86% от общих липидов) и ^{14}C -холин [24]. Поглощение меченого ацетата, пальмитата в общие липиды, ФХ и ДПФХ остается постоянным между 30-ю минутами и 3-мя часами инкубации клеток. Синтез ДПФХ в изолированных АК-2 протекает в 10 раз активнее, чем в АМ [18].

Меченый глицерин появляется в ФХ АК-2 в незначительных количествах. Однако при повышении концентрации изотопа в инкубационной среде он начинает включаться более активно.

Фосфатидилглицерол, представленный в незначительных количествах в фосфолипидах большинства тканей млекопитающих, обнаружен в высоких концентрациях в паренхиме легких. Относительно высо-

кое его содержание наблюдается и в поверхностно-активной фракции легочного смыва. В связи с этим было высказано предположение [24] о том, что ФГ делает значительный вклад в поверхностно-активные свойства легочного сурфактанта и обеспечение стабильности респираторного отдела легких, а также определяет свойства легочного сурфактанта. Небольшие количества ФГ присутствуют в митохондриях клеток различных органов и служат субстратом для синтеза дифосфатидилглицерина (кардиолипина). Поскольку поверхностно-активный материал в альвеолах легких продуцируется альвеолоцитами 2-го типа, то вполне естественно было изучить синтез ФГ в этих клетках *in vitro*. Оказалось, что ФГ изолированных АК-2 из легких взрослых кроликов включает наполовину меньше ^{14}C -глюкозы, чем ФХ, но больше, чем другие фракции фосфолипидов. При синтезе ФГ преимущественно используется пальмитат, в ФГ включается больше ^{14}C -пальмитата, чем во все фракции фосфолипидов, помимо ФХ [24]. Таким образом, ФГ изолированных АК-2 может синтезироваться из глюкозы и жирных кислот, при этом внутриклеточный синтез ФГ протекает намного активнее, чем в АМ [18,24]. Вполне обоснованно можно считать, что ФГ является одним из наиболее функционально-активных фосфолипидов АК-2, так как в него больше, чем в другие фракции, кроме ФХ, включается меченой ^{14}C -глюкозы и ^{14}C -пальмитата.

Изолированные АК-2 оказались удобной модельной системой для выявления внутриклеточного синтеза жирных кислот [11]. Установлено, что в липиды АК-2 интенсивно включается ^{14}C -глюкоза и ^{14}C -лейцин [11,24]. Распределение метки по различным фракциям фосфолипидов происходит неодинаково. Около 90% ^{14}C -глюкозы, включавшейся в ФХ, обнаружено в ДПФХ и 1% в жирно-кислотных остатках. При инкубации изолированных АК-2 с ^{14}C -лейцином приблизительно 50% метки находится в липидах. Наиболее интенсивно ^{14}C -лейцин включают ФХ (71,7%) и ФГ (16,7%). При этом основная часть метки сосредотачивалась в жирно-кислотной фракции эстерифицированных липидов. Приведенные данные свидетельствуют о том, что АК-2 активно участвуют в биосинтезе жирных кислот и могут метаболизировать субстраты для их синтеза.

Поверхностно-активная фракция, выделенная из целых легких, может также включать незначительное количество ^{14}C -лейцина в жирные кислоты. В липидах АМ ^{14}C -лейцин не обнаружен.

Суммируя приведенные выше результаты, можно прийти к выводу, что изолированные АК-2, подвергавшиеся воздействию протеаз, способны выполнять основные функции окисления и гликолиза. При этом внутриклеточные промежуточные пути метаболизма кислорода и глюкозы оказываются интактными, и активно работает биохимический механизм дыхания. Альвеолоциты 2-го типа, изолированные из легких, сохраняют также свойства осуществлять транспорт-

ные процессы, необходимые для поглощения глюкозы, а также для ее метаболических преобразований в цитоплазме и митохондриях. Альвеолоциты 2-го типа синтезируют ДПФХ, используя при этом холин, пальмитат, глицерин, ацетат, глюкозу, олеат, линолеат. Из всех жирных кислот для синтеза ФХ преимущественно используется пальмитат. ФГ может синтезироваться в АК-2 с использованием глюкозы и жирных кислот. Интенсивное включение предшественников синтеза фосфолипидов, высокая специфическая активность ферментов, участвующих в нем, свидетельствуют о функциональной полноценности изолированных альвеолоцитов 2-го типа. Эти клетки являются основным источником альвеолярного сурфактанта.

Пролиферативные возможности АК-2 в культуре

Альвеолоциты 2-го типа являются одной из активно пролиферирующих популяций [2,3,13]. В этих клетках совмещается способность к специфическим синтезам и делению митозом, несмотря на их высокую дифференцировку. При различных воздействиях на легкие именно АК-2 выходят из состояния покоя и начинают пролиферировать. В настоящее время АК-2 рассматриваются некоторыми исследователями как "стволовые" клетки альвеолярной выстилки [2,13].

Для выяснения способности изолированных АК-2 к пролиферации была проведена специальная работа [20]. Взрослым сирийским хомякам внутрибрюшинно однократно вводили ^3H -тимидин, а через 4 ч в фракции изолированных АК-2 определяли удельную активность метки. Высокий уровень ^3H -тимидина в фракции АК-2 свидетельствовал о значительных пролиферативных возможностях этой популяции клеток легких. Однако количественные данные о митотической активности изолированных АК-2 в литературе нами не обнаружены.

Морфофункциональные особенности альвеолоцитов 2-го типа в первичной культуре

Для культивирования АК-2 успешно применяется модифицированная среда Игла, в которую добавляют антибиотики [25]. Концентрация телячьей сыворотки в культуральной среде достигает 10% [1,25]. Для клеток многих органов требуются более низкие (5%) концентрации сыворотки. Исключение составляют эндотелиоциты кровеносных сосудов, для которых оптимальная концентрация сыворотки в культуральной среде должна достигать 20% [1]. В большинстве исследований к среде не добавляют какие-либо стимуляторы роста клеток: формирование монослоя АК-2 и их клонирование возможно в отсутствии факторов роста. Культивирование АК-2, как и клеток большинства органов млекопитающих, осуществляется при 37°C в атмосфере, содержащей 10% CO_2 и 90% воздуха. Смена культуральной среды проводится каждые 48 ч [25].

В зависимости от целей исследования используют краткосрочную (до 24 ч) пролонгированную (до 10 сут) первичную культуру АК-2. В литературе имеются данные о клонировании культуры АК-2 из легких взрослых кроликов и крыс в течение одного года [10].

Альвеолоциты 2-го типа можно культивировать в пластиковых чашках без использования какого-либо субстрата. Исходная плотность АК-2 в начале культивирования в этих случаях достигает $2 \cdot 10^6$ клеток на $2,1 \text{ см}^3$ [4,25]. В течение 1–2 сут жизнеспособные АК-2 прикрепляются к дну пластиковых чашек. В это же время клетки распластаются и формируют монослой.

Митозы в культуре АК-2 из легких взрослых животных, а также из эмбрионального легкого человека встречаются сравнительно редко. Фибробласты, выделенные из эмбрионального легкого человека одновременно с АК-2, пролиферируют более активно и через 20 ч число фибробластов удваивается. Пролиферативная активность АК-2 в слившемся монослое значительно ниже, чем в клетках преконфлюентной культуры. Фенотипические черты АК-2 сохраняются почти полностью в течение первых 3 дней культивирования в обычных условиях в пластиковых чашках [14,23].

В первичной культуре АК-2, поддерживаемой в пластиковых чашках, клетки сравнительно быстро (после 72 ч) начинают утрачивать признаки дифференцировки.

В ряде работ [17,26] показано, что фенотип АК-2 и степень их дифференцировки зависят во многом от субстрата, на котором растут клетки. Если АК-2 из легких взрослых крыс выращивать на фиксированном субстрате из крысиного коллагена 1-го типа, а также на бесклеточном матриксе роговицы [5,19], то лучше сохраняются признаки морфологической дифференцировки в пластиковых чашках, постепенно снижается способность АК-2 к биосинтезу фосфолипидов. В культуре АК-2 из легкого взрослых крыс, расположенных на бесклеточной базальной мембране амниотической оболочки человека, лучше и более продолжительное время (до 8–10 дней) поддерживаются фенотипические характеристики клеток и медленнее утрачивается их способность синтезировать фосфолипиды [17]. В базальной мембране амниотической оболочки присутствует коллаген IV, V типа и ламинин — компоненты нормальных базальных мембран эпителиальных клеток, а также коллаген I и II типов, необходимый для адгезии клеток. При помещении АК-2 на противоположной стромальной стороне амниотической оболочки, лишенной базальной мембраны, происходит раннее заметное уплощение клеток.

Базальная мембрана амниотической оболочки с успехом используется для выращивания *in vitro* не только АК-2, но и эпителиальных клеток поджелудочной железы и эндотелия кровеносных капилляров. В связи с этим бесклеточная амниотическая оболочка может быть рекомендована для культивирования

АК-2, в частности для изучения взаимодействия базальной мембраны и расположенных на ней клеток.

Большое значение имеет не только качество субстрата, на котором культивируются АК-2, но и степень подвижности подложки. Выращивание клеток на флюктуирующих коллагеновых пленках, а также на незакрепленной базальной мембране амниотической оболочки человека [17] способствует значительному замедлению уплощения клеток и более длительному сохранению их функциональной полноценности по сравнению с культивированием АК-2 на аналогичных, но фиксированных субстратах.

При культивировании АК-2 на базальной мембране амниотической оболочки человека клетки имеют кубическую форму, сохраняют полярность и в течение первых 72 ч формируют упорядоченный монослой. Клетки содержат на апикальной поверхности микроворсинки и тот же набор внутриклеточных структур (митохондрий, цистерн эндоплазматической сети, цитофосфолипосом — осмиофильных пластинчатых телец (ОПТ) и т.д.), как и АК-2 интактных легких. Между клетками формируются контакты типа *tight and gap junction*. При помощи иммуноморфологических методов выявлено [26], что АК-2 секретируют коллаген I типа для их новой собственной базальной мембраны. При культивировании АК-2 на противоположной стромальной стороне амниотической оболочки, лишенной компонентов базальной мембраны, клетки уплощаются уже через 48–60 ч. В это время в них появляется небольшое число мелких ОПТ, на апикальной поверхности исчезают микроворсинки; они не секретируют материал для собственной базальной мембраны. Большинство АК-2 в этих условиях отделяется от подложки на 7–8-й день культивирования.

Таким образом, для сохранения фенотипических свойств АК-2, в частности формы и полярности, важно наличие базальной мембраны на субстрате, которая способствует организации монослоя в культуре, а также поддержанию кубической формы клеток и замедлению исчезновения из них цитофосфолипосом (ОПТ). На основании этих выводов можно думать, что повреждение базальной мембраны альвеолярного эпителия легких *in vivo* играет ключевую роль в нарушении фенотипических свойств АК-2.

Вполне вероятно, что для выполнения специфической функции (синтез и секреция альвеолярного сурфактанта) альвеолоцитами 2-го типа необходимо сохранение ими кубической формы и наличие ОПТ, так как показана корреляция между этими признаками.

Степень не только морфологической дифференцировки, но и сохранение функциональной специализации АК-2 во многом зависят от микроокружения, в котором эти клетки находятся в составе легких [22]. В культуре возможно частично воспроизвести это микроокружение, в частности выявить влияние внеклеточного матрикса и базальной мембраны на состояние клеток.

Проведено сравнительное исследование поведения и функции АК-2 при культивировании в различных условиях [22].

Сроки морфологической и функциональной трансформации АК-2, выделенных из легких взрослых крыс и культивируемых в пластиковых чашках, представлены в работе [14]. Отмечено, что уже на 4-й день культивирования АК-2 увеличиваются в размерах, утрачивают полностью свою кубическую форму, в их цитоплазме уменьшается число и размеры цитофосфолипосом. К 10-му дню культивирования в пластиковых чашках во многих АК-2 уже полностью отсутствуют цитофосфолипосомы [14]. Параллельно наступает снижение активности синтеза фосфолипидов (ФХ и ФГ).

Выращивание АК-2 на питательных подложках, состоящих из фибробластов эмбрионального и взрослого легких, эмбриональной кожи, эндотелия бычьей аорты и опухолевых эпителиальных клеток молочной железы крысы, дает такие же результаты, как и культивирование АК-2 на пластиковых чашках.

Однако, если подложки были подвижны, то более продолжительное время сохранялась кубическая форма АК-2, которые больше включали ^{14}C -ацетата, чем клетки, находящиеся в неподвижных пластиковых чашках.

Известно, что базальная мембрана опухолевых клеток (*Engelbreth-Holm-Swarm*) содержит составные части базальных мембран эпителия: коллаген IV типа, ламинин, сульфатированные протеогликаны, енактин, нидоген [23]. При культивировании АК-2 из легких взрослых крыс на такой подложке они образуют агрегаты на 4-й день роста. Сначала клетки прикрепляются к субстрату, скапливаются в небольшие группы, которые увеличиваются к 4-му дню за счет присоединения новых клеток, а не в результате активной их пролиферации. Обратной миграции АК-2 из агрегатов не наблюдается.

Клеточные скопления состоят из кубических АК-2, обладающих морфологической характеристикой более дифференцированных клеток, чем при культивировании их в пластиковых чашках. На 4-й день культивирования клетки активно включают ^{14}C -ацетат в ФГ.

Альвеолоциты 2-го типа первичной культуры секретируют фосфолипиды, выполняя присущую им функцию. Доказательством проявления этого процесса служит прогрессивное уменьшение числа цитофосфолипосом (ОПТ) в цитоплазме клеток по мере срока культивирования, а также появления меченых предшественников (например ^3H -холина) синтеза фосфолипидов в культуральной среде [24,25]. Уровень ^3H -холина в ФХ культуральной среды, где растут АК-2, составляет 10–20% от метки, включенной в ФХ клеток. Однако 60–90% метки приходится на лизофосфатидилхолин, что указывает, с одной стороны, на секрецию фосфолипидов, а с другой — на гидролиз ФХ в культуральной среде. Внутриклеточный меченый лизофосфатидилхолин составляет всего лишь 2% от всего меченого ФХ [25].

Известно, что любые дифференцированные клетки, находясь в культуре, со временем в какой-то мере утрачивают свои специализированные функции. В отношении АК-2 критерием такой утраты служит снижение синтеза фосфолипидов. Показано [25], что ФХ АК-2, только что выделенных из легких взрослых кроликов, включают до 50% ^3H -холина, а на 2-й день культивирования уже 35%, что свидетельствует о снижении синтеза ФХ в культуре АК-2; в течение первых 4 дней культивирования АК-2 постепенно снижается и синтез ФГ, а также ДПФХ. Параллельно уменьшается число цитофосфолипосом (ОПТ) в цитоплазме клеток. С 4-х по 7-е сутки культивирования АК-2 включение ^3H -холина в ФХ начинает уже заметно снижаться, достигая к концу недели лишь 17% от метки, включенной во все фосфолипиды.

Однако следует отметить, что с увеличением возраста культуры АК-2 повышается абсолютное и относительное включение ^3H -пальмитата в общие липиды, в ненасыщенный ФХ, фосфатидилинозитол, сфингомиелин, лизофосфатидилхолин и фосфатидилэтанолламин. Наряду с этим наблюдается относительное и абсолютное снижение включения метки в фосфатидилглицерин и ДПФХ. Наиболее интенсивное нарастание включения ^3H -пальмитата отмечено в нейтральные липиды.

По мнению ряда исследователей [14,25], на протяжении первой недели культивирования АК-2 адаптируются к неорганическим условиям существования. В этот процесс, очевидно, вовлекается вся популяция культивируемых АК-2; при этом не происходит избирательного выживания какой-то отдельной субпопуляции. В результате развития адаптивных реакций происходит морфологическая и функциональная перестройка клеток. Увеличение площади поверхности плазматической мембраны направлено на повышение транспорта питательных веществ, поступающих в клетки, и сохранение их жизнеспособности. Наряду со снижением синтеза фосфолипидов возрастает синтез общих клеточных липидов, особенно ненасыщенных мембранных фосфолипидов. Следовательно, АК-2, выделенные из легких взрослых животных (крыс, кроликов) и культивируемые в пластиковых чашках, продолжают в культуре синтезировать фосфолипиды легочного сурфактанта. Кроме того, они продуцируют мембранные липиды, синтез которых прогрессивно возрастает, отражая активный рост клеточной мембраны. Вместе с тем АК-2 сравнительно быстро (через 4–10 дней культивирования) начинают утрачивать морфофункциональные характеристики, отражающие их специализированную функцию. С течением времени, очевидно, происходит переключение специфического синтеза фосфолипидов на синтез липидов, связанного с ростом протяженности плазматической мембраны в связи с увеличением клеточной поверхности адаптирующихся к новым условиям клеток. Можно предположить, что специфическая функция АК-2, направленная на активный синтез фосфолипидов сурфактанта, находится в

какой-то мере в конкурентных взаимоотношениях с неспецифической метаболической функцией клеток — пополнением пластических веществ, идущих на построение мембран самой клетки. Этот феномен, как можно было видеть, отчетливо проявляется на примере морфологической и функциональной трансформации АК-2 в первичной культуре.

Таким образом, характер взаимодействия клеток друг с другом, а также взаимодействие клеток с микроокружением матрикса, на котором они расположены, оказывает влияние на их фенотипические характеристики.

Действие питательных подложек, по-видимому, носит неспецифический характер.

Большое значение имеет подвижность субстрата, на котором растут АК-2. Можно предположить, что колебательные движения эпителиального пласта в культуре имитируют фазовые состояния альвеолярной эпителиальной выстилки во время цикла вдох — выдох. Не исключено, что фактор флюктуации АК-2 играет определенную роль в дифференцировке этих клеток. Для активного выполнения специфической функции необходим ряд условий: 1) наличие базальной мембраны, 2) сохранение кубической формы АК-2, 3) колебательные движения эпителиального пласта.

Известно, что для эпителиальных клеток, в том числе и АК-2, как *in vivo*, так и в культуре большое значение имеет взаимодействие клеток с базальной мембраной, которая играет исключительную роль в тканевой регенерации. В поврежденных легких она служит каркасом для регенерации альвеолярного эпителия и эндотелия. На основании данных по культивированию АК-2 можно сказать, что базальная мембрана способствует также сохранению степени дифференцированности АК-2.

Знание сроков изменения фенотипа АК-2 после выделения их из легких очень существенно, так как позволяет рекомендовать первичную культуру АК-2 в течение первых 4 сут в качестве модельной системы для изучения кратковременного воздействия гормонов, патогенных факторов и других веществ на синтетические процессы в культивируемых АК-2.

Суммируя приведенные выше данные, можно видеть, что появилась возможность для анализа различных аспектов жизнедеятельности альвеолоцитов 2-го типа *in vitro*. Краткосрочные культуры этих клеток с успехом используются во многих зарубежных работах для изучения различных проблем клеточной биологии легких.

Культивирование изолированных альвеолоцитов 2-го типа открывает новые возможности в изучении метаболических функций легких, межклеточных взаимодействий, нарушение которых тесно связано с патогенезом многих диффузных интерстициальных легочных заболеваний с неясной этиологией. Особого внимания заслуживает изучение взаимодействия альвеолоцитов 2-го типа с легочными фибробластами, синтезирующими пневмотропный фактор, участ-

вующий в регуляции метаболизма и функции клеток альвеолярной выстилки.

Вопрос об эндогенных и экзогенных факторах, участвующих в регуляции физиологической и репаративной регенерации легких, постоянно стоит на повестке дня. Поиск митогенов, синтезируемых различными клетками легких, а также факторов гормональной и нейрогенной природы весьма перспективен. Для понимания механизма возникновения бронхоалоальвеолярного рака (аденоматоза) важно изучение факторов, вызывающих бластомогенную трансформацию альвеолоцитов 2-го типа.

Культура альвеолоцитов 2-го типа в перспективе может быть использована для наработки естественного сурфактанта и применения его при заместительной сурфактант-терапии.

За последние годы внимание исследователей привлекают различные аспекты морфофункциональной адаптации культивируемых альвеолоцитов 2-го типа, полученных из патологически измененных легких (при саркоидозе, синдроме острой дыхательной недостаточности у взрослых, компенсаторном росте легких и т.д.). Такого рода работы не освещены в настоящем обзоре, однако они заслуживают специального рассмотрения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пинаев Г.П. (ред.) Методы культивирования клеток: Сборник науч. трудов. Л.: Наука; 1988.
2. Романова Л.К. Регуляция восстановительных процессов. М.: МГУ; 1984.
3. Романова Л.К. Органы дыхания. В кн.: Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов / Отв. ред. О. В. Волкова и др. М.: Медицина; 1987. 288–334.
4. Diglio C.A., Kikkawa Y. The type II epithelial cells of the lung: adaptation and behaviour of isolated type II cells in culture. *Lab. Invest.* 1977; 37: 622–631.
5. Dobbs L.G., Williams M.C., Brandt A.E. Changes in biochemical characteristics and pattern of lectin binding of alveolar type II cells with time in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 846: 155–166.
6. Elson N.A., Karlinsky J.B., Kelman J.A. et al. Differentiated properties of the type 2 alveolar cells: partial characterization of protein content synthesis and secretion. *Clin. Res.* 1976; 24: 464a.
7. Finkelstein J.N., Shapiro D.L. Isolation of type II alveolar epithelial cells using low protease concentrations. *Lung* 1982; 160: 85–98.
8. Fisher A.B., Furia L. Isolation and metabolism of granular pneumocytes from rat lung. *Ibid.* 1977; 154: 155–165.
9. Fisher A.A., Chander A. Glycerol kinase activity and glycerol metabolism of rat granular pneumocytes in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1982; 711: 128–133.
10. Frosolono M.F., Kress Y., Wittner M., Rosenbaum R.M. Culture characteristics of cells derived from type II pneumocyte enriched fractions from rabbit and rat. *In Vitro* 1976; 12: 708–717.
11. Greenleaf R.D., Mason R.T., Williams M.C. Isolation of alveolar type II cells by centrifugal elutriation. *Ibid.* 1979; 15: 673–684.
12. Hadjivanova N.B., Dimov V.B., Kasachka D.S. et al. Isolation and identification of type II alveolar epithelial cells. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 1989; 42: 117–120.
13. Kauffman Sh.I. Cell proliferation in the mammalian lung. *Intern. Rev. Exp. Pathol.* 1980; 22: 131–191.

14. Kikkawa Y., Yoneda K. The type II epithelial cell of the lung. I. Method of isolation. Lab. Invest. 1974; 30: 76-84.
15. Kikkawa Y., Yoneda K., Smith F. et al. The type II epithelial cells of the lung. II. Chemical composition and phospholipid analysis. Ibid. 1975; 32: 295-302.
16. Kuroki Y., Mason R.J., Voelker D.R. Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 5566-5570.
17. Lwebuga-Mukasa J.S., Thulin G., Madri A. et al. An acellular human amnionic membrane model for *in vitro* culture of type II pneumocytes: the role of the basement membrane in cell morphology and function. J. Cell. Physiol. 1984; 121: 215-225.
18. Mason R.J., Williams M.C., Greenleaf R.D., Clements J.A. Isolation and properties of type II alveolar cells from rat lung. Am. Rev. Respir. Dis. 1977; 115: 1015-1026.
19. Mason R.J., Voelker D.R. Role of intracellular glycerol-3-phosphate in the synthesis of phosphatidylglycerol by freshly isolated adult rat alveolar type II cells. Ibid. 1988; 137: 519-524.
20. Pflieger R.C. Type II epithelial cells from the lung of Syrian hamsters: isolation and metabolism. Exp. Mol. Pathol. 1977; 27: 152-166.
21. Picciano P., Rosenbaum R.M. The type I alveolar lining cells of the mammalian lung. I. Isolation and enrichment from dissociated adult rabbit lung. Am. J. Pathol. 1978; 90: 99-122.
22. Post M., Smith B.T. Histochemical and immunocytochemical identification of alveolar type II epithelial cells isolation from fetal rat lung. Am. Rev. Respir. Dis. 1988; 137: 525-530.
23. Shannon J.M., Mason R.J., Jennings S.D. Functional differentiation of alveolar type II epithelial cells *in vitro*: effects of cell shape, cell-matrix interactions and cell-cell interactions. Biochim. Biophys. Acta 1987; 931: 143-156.
24. Smith F., Kikkawa Y. The type II epithelial cells of the lung. V. Synthesis of phosphatidyl glycerol in isolated type II cells and pulmonary alveolar macrophages. Lab. Invest. 1979; 40: 172-177.
25. Smith F.B., Kikkawa Y., Diglio C.A., Dalen R.C. The type II epithelial cells of the lung. VI. Incorporation of ^3H -cholin and ^3H -palmitate into lipids of cultured type II cells. Ibid. 1980; 42: 296-301.
26. Weller N.E., Karnovsky M.J. Isolation of pulmonary alveolar type I cells from adult rats. Am. J. Pathol. 1986; 124: 448-456.

Поступила 08.12.99

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 612.216.8

С.Н.Авдеев, А.В.Черняк, З.Р.Айсанов

НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОГРАНИЧЕНИЯ ВОЗДУШНОГО ПОТОКА

НИИ пульмонологии Минздрава РФ, Москва

Максимальная легочная вентиляция, которой может достичь человек, ограничена максимальной объемной скоростью (поток), которую он способен производить. В большинстве случаев люди, не страдающие заболеваниями органов дыхания, даже во время интенсивной физической нагрузки, не достигают максимального экспираторного потока [36]. Другими словами, максимальный экспираторный поток человека во время максимальной физической нагрузки остается меньше той величины потока, которую они способны достичь во время одиночного форсированного экспираторного маневра [38]. В то же время при некоторых заболеваниях легких, например при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), у пациентов ограничение экспираторного воздушного потока присутствует даже в покое [25], т.е. спокойное дыхание пациентов с тяжелой ХОБЛ сопровождается достижением максимальных экспираторных потоков, что можно определить по кривой максимальный поток-объем. Необходимо обратить внимание, что термин "ограничение экспираторного воздушного потока" имеет два значения: 1) у данного больного потоковые показатели (в том числе и объем форсированного выдоха за 1 с — ОФВ₁) во время форсированного экспираторного ма-

невра ниже предсказанных теоретических значений; 2) экспираторный поток больного во время спокойного дыхания уже является максимально возможным. В некоторых странах, например во Франции, для преодоления терминологической путаницы предложено использовать разные термины: в первом случае — редукция экспираторного потока (*réduction du débit expiratoire*) и ограничение экспираторного потока (*limitation du débit expiratoire*) — во втором [51]. Данная статья посвящена второму значению понятия "ограничение экспираторного воздушного потока".

Для того чтобы оценить существует ли ограничение воздушного потока при спокойном дыхании, можно применить сравнительный метод, предложенный R. Hyatt в 1961 г. [25]. Суть метода заключается в сравнении кривой поток-объем при спокойном дыхании с соответствующей кривой максимальный поток-объем. Считается, что пациенты, у которых при равных легочных объемах, экспираторная объемная скорость при спокойном дыхании равна или превышает объемную скорость, полученную при выполнении маневра форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), имеют ограничение воздушного потока при спокойном дыхании. На рис.1 представлены пет-