

домленности больных о заболевании и самоконтроль.

В связи с тем, что БА характеризуется многообразием клинических вариантов, изучение наследования которых часто затруднительно, необходимы крупные популяционные исследования, основанные как на новых клинических, так и на точных генетико-статистических подходах. Для сложно наследующихся заболеваний с варьирующим возрастом начала, каким является БА, генетико-эпидемиологический подход с использованием показателей накопленной заболеваемости остается единственным, позволяющим оценить действительную роль наследственных факторов в их развитии.

Кроме того, без знания эпидемиологических данных по отдельным формам болезни в популяции невозможно решить вопрос о генетической гетерогенности заболевания [2].

К тому же для получения достоверных и точных данных необходимы строгий учет больных в поликлиниках, исключение гипердиагностики и увеличение выборки исследования. Ведь чем больше размер популяции, охваченной обследованием, тем более достоверные результаты получают исследователи.

На основе эпидемиологических данных и семейного материала (если проводить семейные исследования) можно проанализировать ассоциации БА с целым рядом заболеваний, выяснить вопросы генетической корреляции БА с другими МФЗ, вычислить показатели повторного риска развития БА с учетом семейного анамнеза. А решение вопроса корреляционных взаимоотношений между такими двумя МФЗ,

как БА и СД, позволяет нам установить наличие или отсутствие каких-либо генетических предпосылок для прогноза развития осложнений терапии БА, таких как нарушение углеводного обмена и ятрогенный (медикаментозный) СД.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаджанова Г.Ю.* Генетические подходы в трактовке сахарного диабета у больных бронхиальной астмой // Пульмонология. — 1991. — № 3. — С.19–21.
2. *Гинтер Е.Г.* Генетико-эпидемиологический подход к решению проблем клинической генетики // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 6. — С.13–17.
3. *Дедов И.И., Сунцов Ю.И., Кудрякова С.В., Рыжкова С.Г.* Национальный регистр сахарного диабета: распространенность инсулинонезависимого сахарного диабета и его осложнений (сообщение 1) // Пробл. эндокринологии. — 1996. — № 4. — С.3–9.
4. *Материалы 2 Всесоюзного конгресса по болезням органов дыхания.* — Челябинск, 1991.
5. *Сафронова О.Н.* Клинико-генетический анализ семейных форм бронхиальной астмы у детей // Материалы научной конф. по клинической генетике. — М., 1971. — С.119–120.
6. *Смирнова Г.И., Смирнов И.Е.* Влияние экологических факторов на формирование респираторных заболеваний и аллергодерматозов у детей. — М.: Союзмединформ, 1991. — С.11–14.
7. *Украинцева С.В., Сергеев А.С.* Популяционный риск возникновения бронхиальной астмы в Москве // Генетика. — 1995. — Т.31, № 2. — С.264–267.
8. *Федосеев Г.Б., Хлопотова Г.П.* Бронхиальная астма. — Л., 1988. — С.9,18.
9. *Фогель Ф., Мотульски А.* Генетика человека. — М., 1989. — С.258–260, 297–299.
10. *Чучалин А.Г.* Бронхиальная астма. — М., 1997. — С.4,419.

Поступила 28.05.99

© РОМАНОВА Л.К., 2000

УДК 616.248-018.74.001.8

Л.К. Романова

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

НИИ морфологии человека РАМН, Москва.

I. Методы получения и идентификации изолированных альвеолоцитов второго типа

Газообмен — основная функция легких. Вместе с тем в настоящее время уже известны многие негазообменные функции этого органа. Легкие активно участвуют в метаболизме липидов, циркулирующих в малом круге кровообращения вазоактивных веществ (катехоламины, брадикинин, простагландины) [7]. Наряду с этим огромная эпителиальная поверхность легких служит барьером, отделяющим внеш-

нюю среду от внутренней среды организма. Во внутренней среде легких происходит инактивация и удаление вдыхаемых частиц различной природы (пыль, микроорганизмы), таким образом выполняется очистительная функция органов дыхания. Для всех функциональных отделений легких большое самостоятельное значение имеет состояние их сурфактантной системы, которая ответственна за поддержание стабильности респираторного отдела легкого (bronхиолы, альвеолярные ходы, альвеолы) [2,5,6].

Легкие — один из наиболее сложно организованных органов. В легких млекопитающих животных и человека идентифицировано около 40 различных клеточных типов [5]. Клеточные типы, включенные в соединительнотканый каркас, имеют свою функциональную специализацию. Значительная клеточная гетерогенность легких затрудняет изучение метаболизма отдельных клеточных популяций этого органа.

Другой уникальной особенностью структуры легких является то, что на большой протяженности (до нескольких десятков квадратных метров) респираторный отдел покрыт непрерывным легочным эпителием, состоящим из клеток двух типов: альвеолоцитов 1-го и 2-го типов [4,5]. Через эту обширную поверхность происходит газообмен между вдыхаемым воздухом и кровью, протекающей через кровеносные капилляры малого круга кровообращения. При дыхании эпителиальная поверхность подвергается воздействию вдыхаемых веществ, находящихся в воздухе и могущих оказывать неблагоприятное воздействие. Вдыхаемые вещества могут оказывать прямое повреждающее действие на легочный эпителий. Кроме того, они могут абсорбироваться на поверхности клеток и вызывать систематические длительные микроповреждения. Как в первом, так и во втором случаях возможно развитие легочной патологии в пределах респираторного отдела органа.

Альвеолоциты 1-го типа занимают до 97% всей альвеолярной поверхности и осуществляют главным образом функцию газообмена, участвуя в формировании воздушно-кровяного барьера. Альвеолоциты 2-го типа расположены на базальной мембране и занимают 3–4% всей альвеолярной поверхности [2,6]. Они контактируют с себе подобными клетками, а также с альвеолоцитами 1-го типа или с нейроэндокринными элементами. Основная функция этих клеток — синтез, накопление, хранение и секреция поверхностно-активных веществ легочного сурфактанта, так называемого антиателектатического фактора. Среди всей популяции около 50–70% альвеолоцитов 2-го типа находится одновременно в состоянии секреции [6]. Эти данные послужили подтверждением концепции о том, что легкие взрослого организма являются активно секреторирующей железой [2,4,5]. Сурфактант представляет комплекс липидов, главным образом фосфолипидов, белков, которые после выхода из клеток абсорбируются на разделе воздух–жидкость респираторного отдела легких и обладают высокими поверхностно-активными свойствами. Благодаря этим свойствам сурфактант поддерживает поверхностное натяжение и предотвращает спадение (ателектаз) альвеол во время выдоха.

Появление альвеолоцитов 2-го типа в развивающихся легких млекопитающих приурочено к последней трети беременности.

В фетальных легких человека альвеолоциты 2-го типа выявлены на 18–24 неделях гестации [5]. Задержка дифференцировки альвеолоцитов 2-го типа

является признаком недостаточной зрелости легких и их сурфактантной системы. Нарушение функции сурфактантной системы в свою очередь может привести к развитию синдрома острой дыхательной недостаточности новорожденных, который довольно часто приводит к гибели. Темпы дифференцировки клеток, продуцирующих сурфактант, во многом зависят от гормонального статуса матери и плода. В связи с этим за последнее время особенно возрос интерес к проблеме гормональной регуляции синтеза и секреции легочного сурфактанта.

Альвеолоциты 2-го типа наряду с выполнением секреторной функции являются активно пролиферирующей популяцией клеток [3,20]. Они служат источником для репаративной регенерации альвеолярной эпителиальной выстилки при различного рода ее повреждениях и гибели части альвеолоцитов 1-го типа, а также в условиях компенсаторного роста легкого после резекции [5].

Основные две функции (секреторная и репродуктивная) альвеолоцитов 2-го типа определяют их метаболические особенности. С нарушением функции альвеолоцитов 2-го типа и метаболизма в этих клетках связано проявление липопроотеиноза — легочного заболевания неясной этиологии. Эти клетки могут быть источником злокачественных опухолевых заболеваний легких (бронхиолоальвеолярный рак или аденоматоз).

В составе целостного организма альвеолоциты 2-го типа подвержены воздействию медиаторов парасимпатической и симпатической нервной системы, а также гормональных факторов [6]. На функциональное состояние альвеолоцитов 2-го типа влияет многообразное клеточное окружение (фибробласты, альвеолярные макрофаги, лимфоциты, эпителиоциты), с которыми они вступают в контакт в процессе межклеточных взаимодействий. В связи с этим чрезвычайно трудно изучать биологию этих клеток в составе целостного организма.

Изучение лёгочных тканевых гомогенатов и эксплантантов также позволяет получить информацию о морфофункциональном состоянии различных типов клеток, из которых состоят лёгкие. Поэтому культура альвеолоцитов 2-го типа представляется уникальным материалом для исследования метаболизма этих клеток и их ответа на различные воздействия.

В настоящее время многие популяции соматических клеток выделены в изолированном виде и изучаются *in vitro*: нейроны и глиальные элементы головного мозга, гепатоциты, купферовские клетки, эндотелиоциты кровеносных капилляров и др. [1].

В 1974 году была впервые предложена методика выделения изолированных альвеолоцитов 2-го типа из легкого взрослых крыс и кроликов [21]. Эта работа послужила стимулом для усовершенствования методических приёмов, а также для использования изолированных альвеолоцитов 2-го типа и их культуры в качестве модельных систем с целью изучения метабо-

лизма и функции этих клеток. Многие годы до появления работ, проведенных на изолированных альвеолоцитах 2-го типа, отсутствовали прямые количественные биохимические данные, свидетельствующие о связи между функцией клеток и синтезом фосфолипидов легочного сурфактанта. Такого рода сведения трудно было получить *in vivo* на целых легких. Сегодня модельная система изолированных альвеолоцитов 2-го типа находит широкое применение для изучения внутриклеточных путей синтеза фосфолипидов *de novo*, особенностей секреции альвеолярного сурфактанта, выявления стимулирующего и ингибирующего действия различных препаратов на синтез и секрецию фосфолипидов, а также для анализа рецепторных свойств и пролиферативных потенций этих клеток.

Процессы дифференцировки альвеолоцитов 2-го типа, внутриклеточный ионный транспорт, свойства аденилатциклазной системы клеток, продукция ими апопротеинов и простагландинов, синтез нуклеиновых кислот, эффект действия на альвеолоциты 2-го типа неблагоприятных факторов, например, озона, — вот тот перечень направлений современных исследований, которые проводятся на модельных системах изолированных альвеолоцитов 2-го типа и их культуре.

Рост числа зарубежных публикаций по затронутой проблеме, появление новых методических подходов делают необходимыми и целесообразными анализы накопившегося в литературе материала и рассмотрение перспектив использования изолированных альвеолоцитов 2-го типа и их культуры в биологических и медицинских исследованиях.

К сожалению, мы не обнаружили работ отечественных авторов, которые бы изучали изолированные клетки лёгких *in vitro*. В связи с этим целью настоящего обзора является ознакомление учёных разного профиля с достижениями мировой науки по этой проблеме и стимулирование исследований в данном направлении.

Методы получения изолированных альвеолоцитов 2-го типа

Альвеолоциты 2-го типа были впервые выделены из легких взрослых крыс и кроликов японскими исследователями [29]. Они разработали тактику подготовки легких перед обработкой клеток в градиенте плотности.

На последовательных этапах получения клеточной взвеси из легких препараты подвергали световой и электронной микроскопии с определением состава, числа клеток и их жизнеспособности. Такой глубокий и тщательный методический подход с использованием сравнительно большого числа экспериментальных животных определил значение этого фундаментального исследования, которое легло в основу многих последующих работ, выполненных в этом направлении [12,13,15,16,17,27].

В настоящее время изолированные альвеолоциты 2-го типа получены из легких 19-дневных плодов [9, 16,30] и взрослых крыс [14,15,21,26], морских свинок [11], кроликов [17], сирийских хомячков [25], а также из 4-дневной органной культуры легкого плода человека [8,16]. Методы, предложенные в вышеуказанных работах, различаются лишь по деталям способа получения изолированных альвеолоцитов 2-го типа, числу выделенных клеток из легких, чистоте клеточной фракции и жизнеспособности клеток. Но они все предусматривают освобождение легких от клеток крови, а также от клеток его внутренней среды (лимфоциты, альвеолярные макрофаги, нейтрофильные и эозинофильные лейкоциты). Важное место занимает ферментативное воздействие на эпителиальные клетки альвеолярной выстилки и разобщение межклеточных связей. Очевидно, поэтому во многих работах используется ряд обязательных приемов, предложенных в 1974 г. [28]. Необходимыми условиями для выделения альвеолоцитов 2-го типа из легких *in vivo* являются следующие: 1) общий глубокий, как правило, пентобарбиталовый наркоз животного; 2) перфузия сосудов малого круга кровообращения физиологическим раствором или средой с антикоагулянтами (гепарин, ЭДТА) до приобретения легкими бледно-розового цвета; 3) многократное интратрахеальное промывание (лаважирование) легких для удаления клеток его внутренней среды; 4) обработка легких протеазами; 5) измельчение паренхимы на маленькие (0,5–1 мм³) фрагменты, получение клеточной взвеси и фильтрация ее через ряд фильтров (нейлоновые сеточки с разной величиной ячеек); 6) последовательные этапы центрифугирования клеточной взвеси, выделенной из легких в градиенте плотности, и получение фракции, богатой изолированными альвеолоцитами 2-го типа; 7) очистка альвеолоцитов 2-го типа от примеси других клеток.

Способы подготовки легких перед выделением из них альвеолоцитов 2-го типа

Очищение легких от крови достигается либо перфузией малого круга кровообращения через легочную артерию (отток перфузата при этом осуществляется через разрез в левом желудочке сердца), либо через канюлю, вставленную в нижнюю полую вену (отток крови в этом случае происходит через разрез в брюшной аорте) [21,22].

В качестве перфузата используется либо охлажденный физиологический раствор (0, 15M NaCl) с добавлением в него 3мМ ЭДТА (pH=7,4), либо среда Игла, либо фосфатный буфер (pH=7,2). При перфузии легких из сосудов малого круга кровообращения вымываются практически все эритроциты. Однако в кровеносных капиллярах все же остаются единичные лимфоциты, что обнаружено при электронной микроскопии легких после перфузии. Причины неполного вымывания лимфоцитов из легких недостаточно ясны.

Вымывание клеток внутренней среды легких осуществляют либо *in situ* в условиях принудительной вентиляции легких, либо после того, как сердечно-легочный комплекс выделен из грудной полости. В трахею вводят катетер, который фиксируется лигатурой, и через него нагнетают один из растворов (физиологический раствор, фосфатный буфер) с $pH=7,2-7,4$, свободный от ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , и затем его отсасывают, получая таким образом бронхоальвеолярный смыв (БАС). Для однократного промывания легких взрослых крыс достаточно 5–10 мл, а для легких взрослых кроликов до 50 мл раствора. *У. Kikkawa* и *К. Yoneda* (1974) специально изучали эффективность многократных промываний легких (от 3 до 15). Установлено, что число клеток внутренней среды, удаленных при промывании легких, возрастает по мере увеличения кратности БАС. При 3-кратном промывании легких было получено $1,50 \times 10^6$, а при 15-кратном — $3,35 \times 10^6$ клеток. На долю альвеолярных макрофагов (АМ) приходится до 97%. По мере повышения кратности БАС в нем снижается относительное содержание АМ и возрастает число лимфоцитов, а также клеток бронхиального и бронхиолярного эпителия. Однако даже после многократных промываний до 20×10^6 альвеолярных макрофагов остается в просвете легких. Наряду с этим показано, что 3–5-кратное промывание легких уже удаляет основную массу АМ, лимфоцитов, полиморфноядерных, эозинофильных и нейтрофильных лейкоцитов, заселяющих внутреннюю среду органа.

Для более полного удаления АМ из легких было предложено два способа: 1) дополнительное вымывание клеток из измельченной паренхимы уже промытых физиологическим раствором легких [21]; 2) интратрахеальное введение в легкие после 3–5-кратного их промывания жидкости, содержащей вещества, активно фагоцитируемые альвеолярными макрофагами. Таким раствором может быть флюороэмульсия, содержащая альбумин и частички угля [23], а также коллоидный раствор сернокислого бария [30]. Заполненные одной из смесей легкие инкубируют 10–20 минут при $+37^\circ C$, а затем промывают их повторно 3–5 раз физиологическим раствором или средой, вымывая АМ, большинство которых удаляется из легких со смывом.

У кроликов легкие после промывания малого круга кровообращения и освобождения его от крови, как правило, выделяют из грудной полости и помещают в охлажденный физиологический раствор или культуральную среду. И только затем производят их промывание [17,22].

Особенности ферментативной обработки паренхимы легких протеазами

Ферментативная обработка легких — необходимый этап при выделении относительно чистой фракции изолированных альвеолоцитов 2-го типа. Фермента-

тивная изоляция этих клеток позволяет избавиться от загрязнения их фибробластами и эндотелиоцитами. Выбор условий ферментативной обработки во многом определяет метаболические свойства изолированных альвеолоцитов 2-го типа, а также их количество, выделенное из легких, и жизнеспособность. В связи с этим важно знать оптимальный режим ферментативной диссоциации клеток легочной паренхимы.

Ферментативная обработка легких проводится двумя способами: 1) добавлением протеаз к обескровленной и измельченной паренхиме легких и 2) интратрахеальным введением и заполнением легких растворами, содержащими протеазы. Действие протеаз осуществляется во время инкубации легочной паренхимы при температуре $+37^\circ C$.

Впервые измельченная паренхима легких взрослых крыс обрабатывалась 1% трипсином [21]. Тканевые блоки размером $0,5 \text{ мм}^3$ подвергали действию фермента различное время: от 5 до 60 минут и контролировали состояние ультраструктурной организации альвеол и клеток под электронным микроскопом. Трипсинизация в течение часа и более полностью разрушает альвеолярные структуры. Оптимальной оказалась 20-минутная инкубация тканей с протеазами, после которой происходит почти полное отделение альвеолярного эпителия от базальной мембраны, на которой он расположен. Вместе с тем базальная мембрана клеток и сами клетки остаются интактными. Интерстициальный компартмент межальвеолярных перегородок, включая кровеносные капилляры и эндотелий, участвующий в формировании воздушно-кровяного барьера, также не повреждается. После 20-минутной трипсинизации можно получить до 10×10^6 клеток из легких взрослой крысы; при этом 32% будут составлять альвеолоциты 2-го типа.

Использование низких концентраций трипсина способствует сохранению жизнеспособности альвеолоцитов 2-го типа. Альвеолоциты 1-го типа, однако, как правило, погибают. Очевидно, поэтому трипсин применяют в концентрациях не более 0,1–10 мг/мл среды или буфера.

Этот фермент иногда все же оказывает повреждающее действие на альвеолоциты 2-го типа. Оно может выражаться в отеке клеток, нарушении структуры мембранных белков клеток, в снижении активности внутриклеточных ферментов, а также в повреждении митохондриальных и ядерных структур.

Для разобщения клеток легких используются и другие протеазы: эластаза, проназа, коллагеназа, а также сочетание протеаз. Первое специальное систематическое исследование по выявлению оптимальных условий обработки легких протеазами появилось в 1982 году [17]. Было показано, что использование низких концентраций комбинации протеаз способствует лучшему сохранению структуры альвеолоцитов 2-го типа и их ферментативной активности. Важно, что комбинация протеаз, например трипсина и эластазы, в значительно меньших концентрациях позво-

ляет выделить большее количество интактных альвеолоцитов 2-го типа, чем при обработке легких только одной из протеаз. Оптимальной концентрацией трипсина является 0,025 мг/мл, а эластазы — 0,3 мг/мл раствора, вводимого в легкие взрослого кролика при их ферментативной обработке обеими протеазами. Большинство органелл альвеолоцитов 2-го типа при этом сохраняет свою ультраструктурную организацию. Кроме того, активность внутриклеточной НАДФН-цитохром-С-редуктазы не снижается после выделения альвеолоцитов 2-го типа. Наряду с этим в надосадочной жидкости среды, где находились клетки, не происходит значительного повышения содержания этого фермента, т. е. не наблюдается его утечка из клеток. Следовательно, сочетанное действие двух протеаз в сравнительно низких концентрациях оказывается довольно щадящим. Выход альвеолоцитов 2-го типа из легких взрослого кролика при интра-трахеальном одновременном введении трипсина и эластазы в 5–7 раз выше, чем при обработке тканевых фрагментов этими же ферментами в тех же дозах. Концепция о значении интратрахеального заполнения легких растворами, содержащими смесь протеаз, для более высокого выхода альвеолоцитов 2-го типа высказана ранее [23] и окончательно доказана в 1982 г. работой *J. Finkelstein* [17].

Не менее важными являются условия, в которых протекает взаимодействие легочной паренхимы с протеазами. Два фактора играют большую роль: 1) время инкубации легких, заполненных раствором, содержащим ферменты и 2) температура, при которой протекает инкубация. Снижение температуры до +15°C при инкубации уменьшает выход альвеолоцитов 2-го типа из легких более чем на 50%, а сокращение времени инкубации до 15 минут снижает выход числа клеток более чем в 3 раза, в то время как при увеличении времени инкубации до 60 минут катастрофически снижается жизнеспособность изолированных клеток [17]. Следовательно, оптимальными условиями инкубации легких, в частности, взрослых кроликов, заполненных раствором, содержащим смесь ферментов (эластазы и трипсина), являются температура +37°C, время инкубации — 20 минут, т. е. такой же режим, который был предложен ранее для легких взрослых крыс [21]. Из большинства исследований вытекает, что при подборе оптимальных наименьших концентраций протеаз (трипсина, эластазы, коллагеназы), использовании наиболее рациональных комбинаций этих ферментов, достаточной их чистоте можно получить значительный выход числа изолированных жизнеспособных альвеолоцитов 2-го типа (до 80–90%), в которых сохраняется активность ферментов фосфолипидного синтеза. Сохранность изолированных клеток после действия протеаз выявляется одним из морфологических методов, позволяющих определить жизнеспособность клеток (для этого используют такие красители, как трипановый синий, нигрозин). Под контролем электронного мик-

роскопа определяется время, за которое клетки альвеолярного эпителия отделяются от базальной мембраны, на которой они располагаются. Структура воздушно-кровяного барьера и кровеносные капилляры при этом не должны нарушаться. Биохимическими методами определяют концентрацию ферментов — маркеров повреждения клеток — в культуральной среде, где находятся альвеолоциты 2-го типа, а также по потреблению O₂ этими клетками.

Остановка действия протеаз — обязательное условие выделения изолированных альвеолоцитов 2-го типа. Через 20 минут после ферментативной обработки легкие заполняют раствором, содержащим ингибиторы протеаз и ДНК-азу 1-го типа, которая предотвращает склеивание клеток. Затем паренхиму легких отделяют от крупных сосудов и бронхов, измельчают ее на фрагменты размером 0,5–1 мм³, подвергают встряхиванию, получая таким образом клеточную взвесь. Последняя многокомпонентна: она содержит альвеолоциты 1-го и 2-го типов, альвеолярные макрофаги, лимфоциты, нейтрофильные и эозинофильные лейкоциты, бронхиальный и бронхиолярный эпителий.

Методы выделения альвеолоцитов 2-го типа из гетерогенной клеточной взвеси

От альвеолоцитов 1-го типа клеточную взвесь освобождают путем фильтрации ее через фильтры размером ячеек 10–15 мкм. Альвеолоциты 2-го типа проходят через отверстия такого размера, а альвеолоциты 1-го типа, как более крупные клетки, остаются на фильтре. После такой процедуры клеточная взвесь содержит 0–1% альвеолоцитов 1-го типа [32]. Выделение альвеолоцитов 2-го типа проводят, как правило, в градиенте плотности. Для этих целей используются различные растворы: фиколл, перколл, альбумин. Фракция изолированных альвеолоцитов 2-го типа, выделенных с помощью градиента плотно-

Таблица

Клеточный состав образцов после использования дополнительных способов очистки фракции альвеолоцитов 2-го типа

Тип клетки	Относительное содержание, %	
	1	2
Альвеолоциты 2-го типа.	88,0±3,0	90,0
Альвеолярные макрофаги	<1,0	1,0
Лимфоциты	11,0±3,0	1,0
Полиморфноядерные нейтрофильные лейкоциты	<1,0	0
Эозинофилы	0	0
Прочие клетки	0	3,0
Эритроциты	0	0

1 — по [19] — выделение альвеолоцитов 2-го типа путем центрифугирования в контрольном потоке. 2 — по [32] — применение дифференциального прилипания клеток (альвеолярных макрофагов, лейкоцитов) после обработки клеточной взвеси антителами к лейкоцитарному антигену.

сти, бывает, однако, загрязнена альвеолярными макрофагами, лимфоцитами, полиморфноядерными нейтрофильными и эозинофильными лейкоцитами. Очевидно, поэтому предложены различные усовершенствования метода, способствующие повышению чистоты фракции альвеолоцитов 2-го типа. Это достигается использованием различных условий центрифугирования в градиенте плотности, клонированием альвеолоцитов 2-го типа, применением дифференциального прилипания клеток, выделения их путем центрифугирования в контрпотоке (*centrifuging elutriation*). После многих из вышеуказанных процедур можно получить клеточную фракцию, содержащую до 80–90% изолированных жизнеспособных альвеолоцитов 2-го типа.

В отдельных работах предложены новые методические подходы, исключающие выделение альвеолоцитов 2-го типа в градиенте плотности [30]. Этим авторам при помощи проточного лазерного клеточного сортера удалось получить фракцию таких клеток высокой чистоты (98%). В отличие от градиента плотности, где клетки дифференцируются только по одному параметру (плотности), в лазерном сортере каждая клетка оценивается по комплексу морфологических характеристик. Достоинством этого методического приема следует признать два момента: 1) сортер способен дифференцировать и выделять альвеолоциты 2-го типа при сравнительно малой их концентрации в клеточной взвеси; 2) за час из клеточной взвеси легких можно выделять до 10×10^5 альвеолоцитов 2-го типа, жизнеспособность которых составляет 90%.

Число получаемых изолированных альвеолоцитов 2-го типа зависит от ряда факторов: вида и линии животных, условий их содержания, а также от режима ферментативной обработки легких. Так, у крыс, лишенных патогенной флоры, выход клеток выше, чем у неинбредных животных, содержащихся в виварии [19,23].

Для освобождения альвеолоцитов 2-го типа от примеси других клеток были также использованы биологические свойства этих клеток. Альвеолоциты 2-го типа не несут на своей поверхности антигенные детерминанты, общие с лейкоцитарным антигеном [32], а также лишены рецепторов к лектинам [29]. Наряду с этим клеточная поверхность альвеолярных макрофагов, лимфоцитов и нейтрофильных гранулоцитов имеет лейкоцитарный антиген, а при добавлении лектина в среду, где находятся альвеолярные макрофаги, клетки начинают склеиваться, образуя конгломераты, которые возможно отделить от изолированных альвеолоцитов 2-го типа. В связи с этим после обычной ферментативной обработки легких и получения клеточной взвеси к ней добавляют 0,2 мл раствора (1 мг/мл) лектина (смеси изолектинов) и инкубируют при $+37^\circ\text{C}$ 30 минут. Во время инкубации происходит агглютинация альвеолярных макрофагов. Альвеолоциты 2-го типа отделяются от них путем фильтрации клеточной взвеси через фильтры с

размером ячеек 37 и 25 мкм. После этого клеточную взвесь пропускают через градиент плотности, получая фракцию, содержащую в среднем $77 \pm 11\%$ альвеолоцитов 2-го типа [29].

В работе N.Weller и M.Karnovsky [32] к клеточной взвеси из легких крыс перед разделением ее на фракции в градиенте плотности добавляли мышинные антитела к лейкоцитарному антигену и затем помещали на субстрат, покрытый антимишиными антителами. Клетки, несущие лейкоцитарный антиген, связываются с субстратом и прилипают к нему. Свободные, не прилипшие, альвеолоциты 2-го типа удаляются из надосадочной жидкости. Фракция альвеолоцитов 2-го типа, полученная после инкубации с антителами к лейкоцитарному антигену, как правило, в большой степени свободна от загрязнения ее альвеолярными макрофагами, лимфоцитами и лишена нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов.

Методы идентификации изолированных альвеолоцитов 2-го типа

Морфологические критерии. Цитологическая характеристика и ультраструктурная организация выделенных из легких взрослых крыс альвеолоцитов 2-го типа довольно обстоятельно представлены уже в первой работе, посвященной разработке метода получения этих клеток [21]. Изолированные альвеолоциты 2-го типа сохраняют полярность; в области апикальной поверхности расположены микроворсинки. Клетки округляются, их диаметр достигает 12–15 мкм [25,28].

При светооптическом исследовании после окраски препаратов по Папаниколау в цитоплазме изолированных альвеолоцитов 2-го типа можно наблюдать ярко-голубые и ярко-синие секреторные гранулы — цитофосфолипосомы, окруженные светлым ободком. Гранулы не выявляются после обработки клеток растворами, экстрагирующими липиды, например, ацетоном или смесью хлороформ:метанол. Во флюоресцентном микроскопе цитофосфолипосомы, богатые фосфолипидами и обладающие высоким сродством к красителю фосфину-3Р, светятся ярко-желтым светом [17,18,23,28]. Среди изолированных альвеолоцитов 2-го типа, как и *in vivo*, изредка встречаются двуядерные клетки [21,32].

Согласно данным ряда авторов [18,23], при электронной микроскопии изолированные альвеолоциты 2-го типа выглядят почти так же, как и клетки интактных легких, фиксированных непосредственно после гибели животного [10]. Большинство органелл сохраняет свою типичную ультраструктурную организацию. Вместе с тем процедура выделения альвеолоцитов 2-го типа из легких в какой-то мере все же отражается на состоянии ультраструктуры клеток. Выявляются некоторые признаки их повреждения, что выражается в расширении перинуклеарного пространства и отдельных цистерн эндоплазматической

сети, отеке некоторых митохондрий и формировании крупных вакуолей. Однако преобладающая часть как гладкой, так и гранулярной эндоплазматической сети, остается интактной. Кроме того, не отмечено разделения внутренней и наружной мембран митохондрий. Матрикс в большинстве митохондрий альвеолоцитов 2-го типа электронноплотный.

R. Vincent, D. Nadeau [31] обнаружили в цитоплазме выделенных из легких взрослых крыс *Long-Evans* трубчатые структуры (*bar-like structures*). Подобные образования иногда встречаются в цитоплазме альвеолоцитов 2-го типа ряда животных (рептилии, птицы, млекопитающие) *in vivo*. Показано, что трубчатые структуры ограничены мембраной, которая является продолжением мембран эндоплазматической сети, либо пластинчатого комплекса Гольджи, либо перинуклеарной мембраны. Иногда трубчатые структуры контактируют с осмиофильными пластинчатыми тельцами ("цитофосфолипосомами"). Функциональное значение трубчатых структур окончательно не выяснено. Однако авторы предполагают, что они отражают определенные этапы внутриклеточного синтеза фосфолипидов. Появление трубчатых структур связывается с нарушением функции цитоскелета клетки.

На центральных ультратонких срезах изолированных альвеолоцитов 2-го типа можно обнаружить сравнительно большое число (до 20) цитофосфолипосом. Эти органеллы рассредоточены по всей цитоплазме и сохраняют первоначальную (как и в клетках легких животных *in vivo*) округлую или овальную форму, типичную пластинчатую структуру и осмиофильность. Они ограничены одинарной мембраной [28].

Структура цитофосфолипосом (характер упаковки пластин, степень их электронной плотности) зависит как от фазы их "созревания" в процессе формирования внутриклеточного материала липидной природы этих своеобразных секреторных гранул, так и от способа подготовки клеток для электронной микроскопии. Использование для дегидратации веществ (хлороформ, метанол, ацетон), экстрагирующих фосфолипиды, способствует удалению липидов из цитофосфолипосом, что отражается на ультраструктуре органелл. Они становятся "пустыми" (с низкой электронной плотностью, без осмиофильной пластинчатой структуризации или исчерченности) [23]. Указанные методические моменты необходимо учитывать при обработке клеточной взвеси, содержащей альвеолоциты 2-го типа.

Изолированные альвеолоциты 2-го типа сохраняют свои физиологические свойства как популяция активно секреторных клеток. Электронная микроскопия позволяет зарегистрировать секрецию путем экстрюзии цитофосфолипосом из альвеолоцитов 2-го типа и проследить за их трансформацией в мембранный материал, который по своей ультраструктурной организации сходен с легочным сурфактантом *in vivo*.

Иммунотомологические признаки. В области апикальной части плазматической мембраны изоли-

рованных альвеолоцитов 2-го типа выявлены рецепторы к агглютину *Maclura pomifera* [14,32]. Данные работы [24] указывают на наличие в плазматической мембране N-ацетилгалактозамина, M-ацетилглюкозамина, O-маннозы, D-галактозы, α -фукозы и сиаловой кислоты.

Таким образом, в настоящее время альвеолоциты 2-го типа выделены из легких различных взрослых животных. Общеизвестной можно считать специальную подготовку легких, заключающуюся в освобождении их от крови путем перфузии малого круга кровообращения; удалении клеток, заселяющих респираторный отдел легких, путем промывания (лаважирования); обработке паренхимы легких протеазами. Использование комбинации протеаз в малых концентрациях способствует достижению двойного эффекта: отделению альвеолоцитов 2-го типа от коллагенового субстрата базальной мембраны, на которой они расположены, а также разобщению межклеточных контактов и в то же время сохранению жизнеспособности большинства клеток этой популяции. Благодаря совершенствованию методических приемов сегодня возможно получение сравнительно чистой фракции, содержащей до 90–98% альвеолоцитов 2-го типа, способных осуществлять метаболические функции в первичной культуре [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы культивирования клеток: Сб. науч. тр. / Под. ред. Г.П. Пинаева. — Л.: Наука, 1988.
2. Романова Л.К. // Вестн. АМН СССР. — 1983. — № 11. — С. 1.
3. Романова Л.К. Регуляция восстановительных процессов. — М.: МГУ, 1984.
4. Романова Л.К. Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток тканей и органов. — М.: Медицина, 1987.
5. Романова Л.К. Физиология дыхания. — СПб.: Наука, 1994.
6. Серебряков И.С. Клеточный состав и секреторная активность легочного эпителия в норме и при изменении функционального состояния вегетативной нервной системы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1984.
7. Сыромятникова Н.В., Гончарова В.А., Котенко Т.В. Метаболическая активность легких. — Л.: Медицина, 1987.
8. Ballard P.L., Ertsey R., Gonzales L.K. et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 1986. — Vol. 883. — P. 335.
9. Batenburg J.J., Funkhouser J.D., Klazina W., Van Golde I.M.G. // Ibid. — 1983. — Vol. 750. — P. 60.
10. Casale J.M., Rochat T.R., Moore K.C., Hunninghake Y. // J. Lab. Clin. Med. — 1987. — Vol. 110. — P. 767.
11. Das S.K., Sikpi M.O., Skolnick P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1987. — Vol. 142. — P. 898.
12. Dobbs L.G., Mason R.J. // J. Clin. Invest. — 1979. — Vol. 63. — P. 378.
13. Dobbs L.G., Geppert E.F., Williams M.C. et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 1980. — Vol. 618. — P. 510.
14. Dobbs L.G., Williams M.C., Brandt A.E. // J. Cell Biol. — 1983. — Vol. 97. — P. 332.
15. Dobbs L.G., Williams M.C., Brandt A.E. // Biochim. Biophys. Acta. — 1985. — Vol. 846. — P. 155.
16. Elson N.A., Karlinsky J.B., Kelman J.A. et al. // Clin. Res. — 1976. — Vol. 24. — P. 464.
17. Finkelstein J.N., Shapiro D.L. // Lung. — 1982. — Vol. 160. — P. 85.
18. Fisher A.B., Furia L., Berman H. // J. Appl. Physiol. — 1980. — Vol. 49. — P. 743.

19. *Greenleaf R.D., Mason R.J., Williams M.C.* // In Vitro.- 1979.- Vol.15.- P.673.
20. *Kauffman Sh. I.* // Intern. Rev. Exp. Pathol.- 1980.- Vol.22.- P.131.
21. *Kikkawa Y., Yoneda K.* // Lab. Invest.- 1974.- Vol.30.- P.76.
22. *Leary J.F., Finkelstein J.N., Notter R.H.* // Am. Rev. Respir. Dis.- 1982.- Vol.125.- P.326.
23. *Mason R.J., Williams M.C., Greenleaf R.D., Clements J.A.* // Ibid.- 1977.- Vol.115.- P.1015.
24. *Mehan C.J.* // J. Anat.- 1986.- Vol.146.- P.131.
25. *Pfleger R.C.* // Exp. Mol. Pathol.- 1977.- Vol.27.- P.152.
26. *Post M., Smith B.T.* // Am. Rev. Respir. Dis.- 1988.- Vol.137.- P.525.
27. *Shannon J.M., Mason R.J., Jennings S.D.* // Biochim. Biophys. Acta.- 1987.- Vol.931.- P.143.
28. *Sikpi M.O., Nair C.R., Johns A.E., Das S.K.* // Ibid.- 1986.- Vol.877, P.20.
29. *Simon R.H., McCoy Ph., Chu A.E. et al.* // Ibid.- Vol.885, P.34.
30. *Van Golde L.M., Den Breejen J.N., Batenburg J.J.* // Biochem. Soc. Trans.- 1985.- Vol.13, P 1087.
31. *Vincent R., Nadeav D.* // Am. J. Anat.- 1987.- Vol.179, P.70.
32. *Weller N.K., Karnovsky M.J.* // Am. J. Pathol.- 1986.- Vol.124, P 448.

Поступила 01.12.99