

О. В. Макарова, Л. П. Михайлова, А. С. Сладкопевцев, И. Е. Зыкова,
Т. А. Турусина

**ВЛИЯНИЕ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА КЛЕТОЧНЫЙ
СОСТАВ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО СМЫВА И ФАГОЦИТАРНУЮ
СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МАКРОФАГОВ ЛЕГКИХ
КРЫС WISTAR**

Акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения»

**INFLUENCE OF NORMOBARIC HYPOXIA ON THE CELL CONTENT OF
BRONCHO-ALVEOLAR LAVAGE AND PHAGOCYTIC CAPACITY OF NEUTROPHILS
AND MACROPHAGES FROM WISTAR RAT'S LUNGS.**

O. V. Makarova, L. P. Mikhailova, A. S. Sladkopevtzev, I. E. Zyкова, T. A. Turusina.

Summary

The results of the study have shown that single hypoxic stimulation increases the content of neutrophils and epithelium cells in broncho-alveolar fluid (BAF) and stimulates phagocytic activity of cells from the lung tissue. 24 hours after the single stimulation as well as during repeated stimulations the cell content of the BAF remains the same. Parameters of phagocytic activity of neutrophils and macrophages are normalized. 24 hours after single hypoxic stimulation a decrease in BAF cytosis is marked, which is connected with high adhesive ability of activated phagocytes. After 10 hypoxic stimulations the rise of lymphocytes, as well as of neutrophils and epithelium cells was marked in BAF of the Wistar rats. Multiple hypoxic stimulation stimulates the phagocytic activity of BAF cells.

Резюме

В эксперименте использовали крыс породы Wistar (самцы) массой 300 гр. Проводили непрерывную 30 минутную экспозицию животных в негерметичной камере, через которую пропускали смесь азота и воздуха, содержащую 10 % O₂. Контрольная группа животных находилась в условиях атмосферного воздуха, опытные группы крыс исследовались после однократной, через сутки после однократной и многократной (10 ежедневных сеансов) гипоксической нагрузки. Определяли абсолютное количество клеточных элементов в 1 мл бронхоальвеолярного смыва (БАС), подсчитывали эндопульмональную цитограмму, оценивали фагоцитарную способность фагоцитов легких. Показано, что однократная гипоксическая нагрузка увеличивает содержание нейтрофилов и эпителия в БАС, а также стимулирует поглотительную способность фагоцитов легких. Через сутки после однократного и при многократном гипоксическом воздействии изменения клеточного состава БАС сохраняются: остаются повышенными показатели содержания нейтрофилов и эпителия. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов легких нормализуются. Через сутки после однократного гипоксического воздействия выявлено снижение показателей цитоза БАС, что связано с высокой адгезивной способностью активированных фагоцитов. После 10 сеансов гипоксии в БАС крыс обнаружено наряду с увеличением относительного количества нейтрофилов и эпителия повышение показателя содержания лимфоцитов. Многократная гипоксическая нагрузка стимулирует поглотительную способность фагоцитов БАС.

В последние годы нормобарическая гипоксия используется пульмонологами в качестве немедикаментозного метода лечения хронического бронхита и бронхиальной астмы [2, 3, 5]. В механизмах местной защиты легких при этих заболеваниях большая роль играют макрофаги и нейтрофилы бронхоальвеолярного пространства [4], однако влияние острой нормобарической гипоксии на клеточный состав бронхоальвеолярного смыва

(БАС) и функциональную способность фагоцитов легких не исследовалось.

Целью работы было изучение цитологических особенностей БАС и фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов легких крыс породы Wistar при однократной и многократной гипоксической нагрузке.

В эксперименте, выполненном в осенне-зимний период, исследовали крыс породы Wistar (самцы)

Таблица 1

Показатели цитоза БАС и эндопульмональной цитограммы крыс Wistar в норме и при гипоксической нагрузке

Группа наблюдения	Цитоз клеток в 1 мл, $\cdot 10^6$	Эндопульмональная цитограмма, %			
		Макрофаги	Лимфоциты	Нейтрофилы	Эпителий
1-я (n=10)	$0,6 \pm 0,2$	$86,9 \pm 3,4$	$4,7 \pm 2,4$	$2,0 \pm 0,4$	$4,6 \pm 2,0$
2-я (n=13)	$0,6 \pm 0,1$	$65 \pm 10,2$	$3,4 \pm 1,1$	$21,1 \pm 7,9$	$9,4 \pm 3,0$
3-я (n=5)	$0,1 \pm 0,05$	$74,2 \pm 3,4$	$1,7 \pm 0,8$	$7,8 \pm 2,6$	$14,7 \pm 3,8$
4-я (n=10)	$0,4 \pm 0,1$	$35,0 \pm 6,9$	$11,4 \pm 2,7$	$38,8 \pm 8,4$	$14,7 \pm 2,0$
p_{1-2}	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$
p_{1-3}	$<0,01$	$>0,05$	$>0,05$	$<0,01$	$<0,05$
p_{2-3}	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$
p_{1-4}	$<0,05$	$<0,001$	$>0,05$	$<0,001$	$<0,05$
p_{2-4}	$>0,05$	$>0,05$	$<0,05$	$>0,05$	$>0,05$

Примечания. Здесь и в табл. 2. p — достоверность различий между показателями в группах.

массой 300 г. Проводили непрерывную 30-минутную экспозицию животных в негерметичной камере, через которую пропускали смесь азота и воздуха, содержащую 10 % O_2 . Перед взятием бронхоальвеолярного смыва животных наркотизировали внутривенным введением гексенала. БАС получали путем двукратного промывания легких через трахею 10 мл подогретого до $37^\circ C$ изотонического раствора хлорида натрия. Сеансы гипоксического воздействия проводили в 10—12 часов дня. Контрольная (1-я) группа животных находилась в условиях атмосферного воздуха, содержащего 21 % O_2 . В группе животных, подвергавшихся однократному гипоксическому воздействию (2-я группа), БАС получали через 5—15 мин после сеанса. В 3-й группе забор БАС проводили через сутки после однократного гипоксического воздействия. В 4-й группе животным проводили ежедневные 30-минутные сеансы в течение 10 дней (многократная гипоксическая нагрузка). Забор смыва в этой группе осуществляли через 5—15 мин после 10-го сеанса.

В жидкости БАС определяли цитоз (абсолют-

ное количество клеток в 1 мл). В мазках, окрашенных по Романовскому—Гимзе, проводили подсчет эндопульмональной цитограммы [1] с учетом эпителия. Жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим составила 87—90 %. Фагоцитарную способность нейтрофилов и макрофагов оценивали после соответствующей 15- и 30-минутной инкубации клеток БАС с суточной культурой *Staphylococcus epidermidis* (штамм Т-10). В мазках, окрашенных по Граму, подсчитывали процент фагоцитирующих клеток и фагоцитарный индекс. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты исследования клеточного состава БАС и фагоцитарной способности нейтрофилов и макрофагов легких контрольной и опытной групп представлены в табл. 1 и 2.

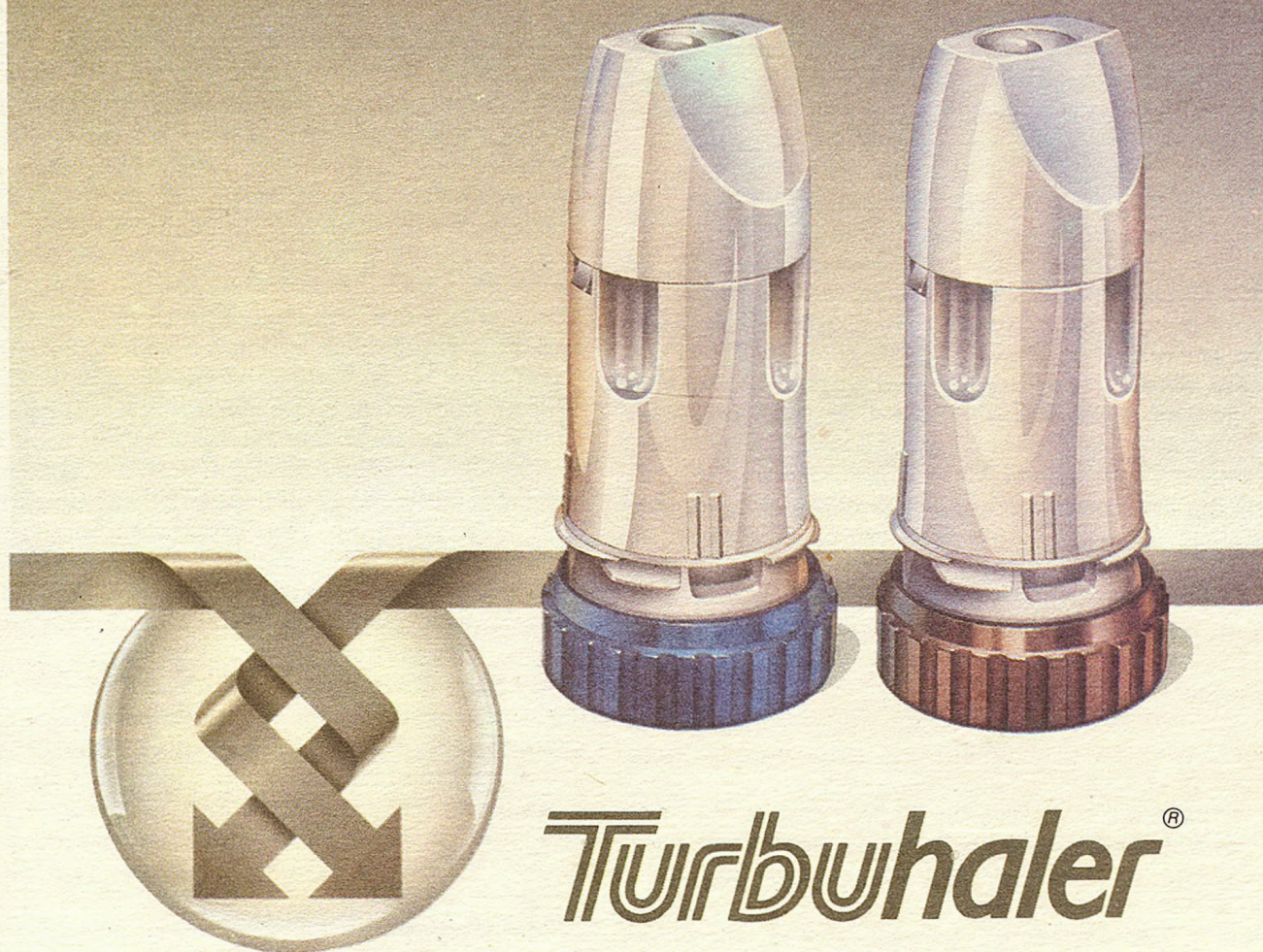
В контрольной группе животных показатели БАС соответствовали норме [7]. Абсолютное количество клеточных элементов в 1 мл БАС составило $0,6 \cdot 10^6$. В эндопульмональной цитограмме большая часть клеток была представлена макрофагами. Относительное содержание нейтро-

Таблица 2

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов БАС крыс Wistar в норме и при гипоксической нагрузке

Группа наблюдения	Фагоцитирующие клетки, %		Фагоцитарный индекс	
	нейтрофилы	макрофаги	нейтрофилы	макрофаги
1-я (n=10)	$57,0 \pm 6,6$	$61,4 \pm 6,4$	$3,3 \pm 1,4$	$3,4 \pm 0,6$
2-я (n=5)	$92,7 \pm 5,0$	$88,0 \pm 5,2$	$9,1 \pm 1,2$	$8,9 \pm 1,8$
3-я (n=5)	$50,6 \pm 6,3$	$63,2 \pm 6,8$	$2,6 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,7$
4-я (n=7)	$71,3 \pm 6,3$	$72,4 \pm 4,2$	$4,9 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,6$
p_{1-2}	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$
p_{1-3}	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$
p_{2-3}	$<0,01$	$<0,01$	$<0,001$	$<0,01$
p_{1-4}	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$<0,01$
p_{2-4}	$<0,05$	$>0,05$	$<0,01$	$>0,05$

Technology
that simplifies
technique



Turbuhaler®

*Turbuhaler is available for inhalation of the β_2 -agonist
TERBUTALINE and the corticosteroid BUDESONIDE*

ASTRA

Further information is available on request from
Astra Draco AB
P.O. Box 34, S-221 00 Lund, Sweden

ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО В МОСКВЕ:

Краснопресненская наб. 12
Офис 903, этаж 9
Москва 123610

Телефон
253 29 80, 253 29 81
Телекс 413921

Prepared by Lewis and Gace
Client: Astra Draco
Product: Turbuhaler
Job#: AD 8261
Size: 148 mm x 210 mm
4/Color Ad

филов, лимфоцитов и эпителиальных клеток было низким. Фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов БАС была примерно сходной.

После однократной 30-минутной гипоксической нагрузки абсолютное количество клеток в БАС по сравнению с контролем не изменялось. В то же время в эндопульмональной цитограмме значительно возрастало содержание нейтрофилов и эпителиальных клеток. Относительное количество лимфоцитов оставалось низким и достоверно не изменялось по сравнению с контролем. Фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов усиливалась. Отмечалось достоверное увеличение процента фагоцитирующих клеток и фагоцитарного индекса.

Полученные результаты показывают, что острая однократная гипоксическая нагрузка увеличивает миграцию нейтрофилов в бронхоальвеолярное пространство, усиливает десквамацию эпителия и стимулирует поглотительную способность фагоцитов легких.

Через сутки после однократного гипоксического воздействия показатель цитоза БАС по сравнению с контролем достоверно снижался. Отмечалась тенденция к снижению относительного количества нейтрофилов по сравнению с предыдущей группой животных. По сравнению с контролем показатели содержания нейтрофилов и эпителия в БАС крыс этой группы были достоверно повышены. Фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов через сутки после гипоксического воздействия не отличалась от контроля.

Таким образом, через сутки после однократного гипоксического воздействия уменьшение показателей цитоза БАС сопровождалось повышением относительного содержания нейтрофилов и эпителия. Функциональная активность нейтрофилов и макрофагов, усиленная гипоксическим воздействием, нормализовалась.

После многократной гипоксической нагрузки показатели цитоза БАС были достоверно снижены по сравнению с контрольной группой. В эндопульмональной цитограмме, по сравнению с контролем, достоверно повышалось относительное количество нейтрофилов и эпителиальных клеток. По сравнению с животными, подвергшимися однократному гипоксическому воздействию, при многократной гипоксической нагрузке в БАС наблюдалось достоверное увеличение содержания лимфоцитов. Показатели поглотительной способности фагоцитов были повышены по сравнению с контролем, но снижены по сравнению со 2-й группой животных.

Таким образом, при многократной гипоксической нагрузке снижались показатели цитоза БАС, а относительное содержание нейтрофилов, эпителия и лимфоцитов в бронхоальвеолярном пространстве было повышено. Фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов легких при этом режиме гипоксической нагрузки была усилена.

Полученные нами результаты исследования клеточного состава БАС и функциональной способности фагоцитов легких свидетельствуют о том, что острая нормобарическая гипоксия стимулирует миграцию нейтрофилов в бронхоальвеолярное пространство, усиливает десквамацию эпителия бронхов, повышает фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов. Однократная гипоксическая нагрузка газовой смесью, содержащей 10 % O_2 , увеличивает в БАС крыс Wistar процентное содержание нейтрофилов и эпителиальных клеток, а также стимулирует поглотительную способность фагоцитов легких. Через сутки после однократного гипоксического воздействия изменения клеточного состава БАС крыс Wistar сохраняются. Показатели содержания нейтрофилов и эпителия остаются повышенными. Фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов легких нормализуется. Через сутки после однократного и после многократного гипоксического воздействия выявлено снижение показателей цитоза БАС. Многократная гипоксическая нагрузка газовой смесью, содержащей 10 % O_2 , увеличивает в БАС крыс Wistar процентное содержание нейтрофилов, эпителия и лимфоцитов, а также стимулирует поглотительную способность фагоцитов легких.

Выявленное нами повышение миграционной способности нейтрофилов под влиянием гипоксической нагрузки обусловлено изменением адгезивной способности эндотелия и нейтрофилов, а также выделением тучными клетками веществ, являющихся хематтрактантами. Schientti et al. [10] показали, что через 30 минут от начала гипоксического воздействия в эндотелиальных клетках выявляется максимальная продукция активных форм кислорода, которые, повреждая мембраны и изменяя адгезивность клеток, приводят к увеличению в легких маргинального пула нейтрофилов. Повышение под влиянием гипоксии миграционной способности нейтрофилов в бронхоальвеолярное пространство связано также с усилением дегрануляции тучных клеток. Nadziejko et al. [9] показали снижение объемной плотности гранул тучных клеток легких кошек под влиянием гипоксии, что свидетельствует о высвобождении простагландина E_2 , лейкотриена B_4 , фактора активации тромбоцитов и гистамина. Эти вещества, являясь хематтрактантами, активируют нейтрофилы и макрофаги легких, что подтверждается нами по усилению их фагоцитарной способности. Активированные фагоциты легких образуют кислородные радикалы, перекиси и протеазы, повреждающие эпителий. Через сутки после однократной гипоксической нагрузки повышенная миграция нейтрофилов и десквамация эпителия сохраняются, а фагоцитарная способность нейтрофилов и макрофагов нормализуется. По сравнению с однократной при многократной гипоксической нагрузке мы не обнаружили усиления миграционной способности нейтрофилов и десквамации эпителия, что, возможно, связано с компенсаторной акти-

вацией ферментов антиоксидантной системы [6]. Выявленное нами увеличение содержания лимфоцитов в БАС при многократной гипоксической нагрузке может быть обусловлено гиперплазией бронхоассоциированной лимфоидной ткани, регулирующей пролиферативные процессы в легких, вызванные гипоксическим повреждением [6]. Снижение в БАС крыс абсолютного количества клеточных элементов через сутки после однократной и после многократной гипоксической нагрузки является относительным. По-видимому, высокая адгезивная способность активированных гипоксией фагоцитов затрудняет их вымывание при проведении процедуры БАС.

Выводы

1. Однократная гипоксическая нагрузка газовой смесью, содержащей 10 % O₂, увеличивает в БАС крыс Wistar процентное содержание нейтрофилов и эпителиальных клеток, а также стимулирует поглотительную способность фагоцитов легких.

2. Через сутки после однократного гипоксического воздействия изменения клеточного состава БАС у крыс Wistar сохраняются: остаются повышенными показатели содержания нейтрофилов и эпителия. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов легких нормализуются.

3. Через сутки после однократного и после многократного гипоксического воздействия выявлено снижение показателя цитоза БАС, что свя-

зано с высокой адгезивной способностью активированных фагоцитов.

4. Многократная гипоксическая нагрузка газовой смесью, содержащей 10 % O₂, увеличивает в БАС крыс Wistar процентное содержание нейтрофилов, эпителия и лимфоцитов, а также стимулирует поглотительную способность фагоцитов легких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А. П., Лукомский Г. И., Романова Л. К. и др. // Сов. мед.— 1982.— № 7.— С. 8—14.
2. Александров О. В., Винницкая Р. С., Давыдов Э. Г., Стручков П. В. // Тер. арх.— 1991.— № 3.— С. 96—99.
3. Карац Ю. М., Стрелков Р. Б., Чижов А. Я. Нормобарическая гипоксия в лечении, профилактике и реабилитации.— М.: Медицина, 1988.
4. Копьева Т. М., Макарова О. В., Михайлова Л. П. Иммунная система легких в норме и при хронических неспецифических заболеваниях // Арх. пат.— 1986.— № 3.— С. 86—89.
5. Миррахимов М. М. Бронхиальная астма и ее лечение гипобарической гипоксией.— Л.: Медицина, 1983.
6. Меерсон Ф. З. Общий механизм адаптации и профилактики.— М.: Медицина, 1973.
7. Blythe S., Ingham D., Esser B., Jank P. // Am. Rev. Respir. Dis.— 1986.— Vol. 134.— P. 1246—1251.
8. Butcher E. C. // Am. J. Pathol.— 1990.— Vol. 136, N 1.— P. 3—11.
9. Nadziejko C. E., Lond A. V., Kikkawa X. // Am. Rev. Respir. Dis.— 1989.— Vol. 140.— P. 743—748.
10. Schientti M. L., Sbarbati R., Scarlattini M. // Cardiovasc. Res.— 1989.— Vol. 23.— P. 76—80.

Поступила 31.03.92.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.24-002.282-092

В. В. Ерохин, Л. Н. Лепеха, Л. Е. Гедымин, Г. М. Николаева ОСОБЕННОСТИ МАКРОФАГАЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ НЕКОТОРЫХ ГРАНУЛЕМАТОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

Центральный НИИ туберкулеза РАМН, г. Москва

SPECIFIC FEATURES OF MACROPHAGEAL REACTION IN SOME GRANULOMATOUS LUNG DISEASES.

V. V. Erokhin, L. N. Lepekha, L. E. Gedymin, G. M. Nikolaeva.

Summary

Biopsy material and broncho-alveolar lavage from 146 patients with disseminated tuberculosis, 104 — with sarcoidosis and 36 patients with allergic alveolitis were used to assess heterogeneity of macrophageal elements and to reveal peculiarities of macrophageal reaction of the lungs taking into account the stage of disease. Data are of practical importance for differential diagnostics of histologically similar granulomatous lung diseases.

Резюме

На материале легочных биоптатов и бронхоальвеолярного лаважа, полученных от 146 больных диссеминированным туберкулезом, 104 больных саркоидозом, 36 больных экзогенным аллергическим альвеолитом, дана оценка гетерогенности макрофагальных элемен-