

*В.Ф.Дубровская, Ю.А.Кириллов, В.А.Волчков, О.В.Клестова, О.Ю.Миролубова,
А.Э.Шульга, Л.В.Лошакова, А.А.Сейлиев, О.А.Розенберг*

**МОДИФИКАЦИЯ РАДИОИНДУЦИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ ЛЕГКИХ
ИНТРАТРАХЕАЛЬНЫМ ВВЕДЕНИЕМ
ФОСФАТИДИЛХОЛИН-ХОЛЕСТЕРИНОВЫХ ЛИПОСОМ**

Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт МЗ РФ
(Санкт-Петербург), Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова МЗ РФ

**MODIFICATION OF X-RAY-INDUCED LUNG PATHOLOGY AFTER INTRATRACHEAL ADMINISTRATION OF
PHOSPHATIDYLCHOLINE-CHOLESTEROL LIPOSOMES**

*V.F.Dubrovskaya, Yu.A.Kirillov, V.A.Volchkov, J.V.Klestova, O.Yu.Mirolubova, A.E.Shulda, L.V.Loshakova,
A.A.Seiliev, O.A.Rosenberg*

S u m m a r y

The possibility of correction of X-ray-induced rat lungs pathology was investigated after a single intratracheal administration of phosphatidylcholine-cholesterol liposomes in dose 40 mg per kg of body weight. The right rat lung was irradiated in dose 12 or 14 Gr once. The lung tissue underwent histological and electron-microscopic examination using morphometric methods in 7 and 13 weeks after irradiation. The decrease of intensity and extension of radial alveolitis was revealed. Ultrastructure alteration of some alveolocapillary barrier elements in treated animals was lower than in untreated ones. Intratracheal liposome administration can be used in complex therapy for the reduction of the severity of radio-induced lung injury.

Р е з ю м е

Исследовали возможность коррекции развития лучевой патологии легких крыс путем однократного интратрахеального введения фосфатидилхолин-холестериновых липосом в дозе 40 мг фосфолипидов на 1 кг. Правое легкое крыс однократно облучали в дозах 12 или 14 Гр. Через 7 и 13 недель после лучевого воздействия проведено гистологическое и электронно-микроскопическое исследование ткани легкого с применением морфометрических методов. Выявлено уменьшение выраженности и распространенности лучевого альвеолита, а также нарушений ультраструктуры элементов аэрогематического барьера у пролеченных животных. Интратрахеальное введение липосом может быть использовано в комплексной терапии для ослабления тяжести радиоиндуцированной патологии легких.

Согласно результатам клинических наблюдений одним из наиболее частых и тяжелых последствий лучевой терапии злокачественных новообразований внутригрудной локализации является легочная патология. Комплексы лекарственных препаратов и немедикаментозные методы, используемые в клинической практике для профилактики и терапии лучевых пневмонитов, недостаточно эффективны. Известно, что одним из ранних проявлений повреждающего действия радиации на ткань легкого являются нарушения в его сурфактантной системе [5]. Они вносят существенный вклад в тяжесть первичного лучевого поражения структуры и функции аэрогематического барьера.

Ранее нами было показано, что через 24—48 часов после интратрахеального введения здоровым крысам липосом из яичного лецитина (фосфатидилхолина — ФХ и холестерина — Хс) наблюдается существенное, но преходящее увеличение содержания сурфактанта (СТ) в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ)

и модификация активности ряда иммунокомпетентных клеток [8]. Известно также, что гидрофильные сурфактантассоциированные белки группы А и Д обладают выраженными иммунорегуляторными свойствами, и, кроме того, будучи С-лектинами, способны агрегировать и инактивировать некоторые бактерии и вирусы [10].

В связи с изложенным, цель работы состояла в выяснении возможности вмешательства в развитие лучевой патологии легких путем интратрахеального введения ФХ-Хс липосом.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы

Опыты проведены на 32 нелинейных белых крысах-самцах массой 180—200 г. Животное, находившееся под наркозом (нембутал внутривентриально, 40 мг/кг), фиксировали в естественном положении тела. Во время лучевого воздействия (РУМ-17, напряжение 200 кВ, сила тока 15 мА, фильтры 0,5 мм Cu+1,0 мм

А1, кожно-фокусное расстояние 25 см, мощность дозы 32 мГр/с, коэффициент неравномерности распределения дозы по горизонтали — не более 1,03) животное находилось под свинцовым экраном толщиной 6 мм с "окном" (3 см × 2,5 см), расположенным над правым легким латерально от тел позвонков. Однократное локальное облучение проводили в дозах 12 или 14 Гр.

Большие олигослойные липосомы (БОЛ) получали методом обращения фаз [9] из смеси соевого ФХ (*Phospolipon-100, Natterman Pospholipids*) и Хс (*Sigma*) при молярном соотношении 1:1. Конечная концентрация липидов в препарате липосом составляла 40 мг ФХ и 20 мг Хс в 1 мл эмульсии, а средняя величина везикул, измеренная методом спектра мутности [2], составила 1,7 мкм.

Через 15 мин после лучевого воздействия одной группе крыс интратрахеально вводили 0,2 мл БОЛ (40 мг ФХ/кг), а другой — тот же объем изотонического раствора NaCl (ФР).

Через 7 и 13 недель после облучения животных выводили из опыта путем пересечения почечной артерии под нембуталовым наркозом (80 мг/кг).

Для гистологического исследования легкие фиксировали в 10% растворе формалина. Парафиновые срезы толщиной 6—7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. Для изучения материала на ультраструктурном уровне кусочки ткани из периферических зон легкого фиксировали в 2,5% глутаральдегиде с последующей обработкой для получения ультратонких срезов, которые после контрастирования просматривали в электронном микроскопе JEM-100В. Морфометрические исследования на световом и ультраструктурном уровнях проводили с использованием тест-точечного метода [1,3]. Для сравнения средних величин использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования

Гистологическое исследование трахеи, бронхов и периферических зон легкого у необлученных животных,

получавших интратрахеально ФР или БОЛ не выявили каких-либо нарушений в структуре органа на протяжении всего срока эксперимента. Показано также, что ингаляции ФР не модифицируют степень тяжести и скорость развития радиоиндуцированной патологии легких. Поэтому результаты количественного анализа состояния легочной ткани у животных без введения БОЛ и ингалированных ФР объединенных в одну группу.

Характер изменений в ткани облученного легкого крыс и их модификация после введения БОЛ

Через 7 недель после облучения в дозах 12 или 14 Гр наблюдались очаговые расстройства кровообращения. Эпителий ряда крупных бронхов отечен со слизистым содержимым в их просветах. Межальвеолярные перегородки утолщены за счет усиления экссудации, а также очагов инфильтрации круглоклеточными элементами. Воздействие в дозе 14 Гр приводило в этот период не только к интерстициальному, но и к внутриальвеолярному выпоту жидкости. Объем ткани легкого с данным видом патологии составлял 20—25%. В зонах периваскулярных и перибронхиальных фиброзных футляров отмечались отечность и разволокнение коллагеновых пучков с нарастанием их пикринофилии. Прилегающие участки ткани инфильтрированы лимфоцитами и единичными нейтрофилами. В клетках альвеолярного эпителия в большинстве зон облученного легкого наблюдались признаки дистрофии. Слущенные покровные элементы вместе с макрофагами находились в альвеолах, частично либо полностью выполняя их просветы. Такая картина часто регистрировалась у животных, облученных в дозе 14 Гр.

Таким образом, через 7 недель после облучения в дозах 12 или 14 Гр на гистологических препаратах диагностировались признаки текущего альвеолита (экссудативного и продуктивного компонентов) с преобладанием отечной фазы его развития.

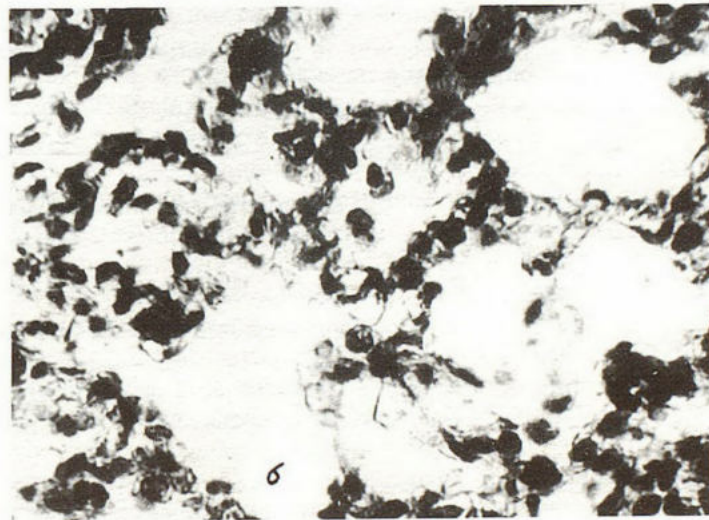
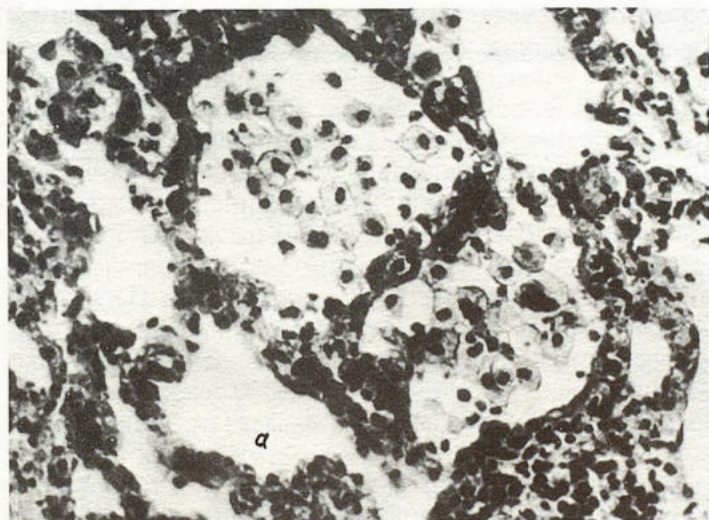


Рис. 1. Участок ткани легкого с явлениями альвеолита через 7 недель после облучения в дозе 12 Гр (А) и последующего введения БОЛ (Б).

Выраженная десквамация эпителиальных клеток и макрофаги в полости альвеол у нелеченых крыс. Гематоксилин-эозин. ×400 (А). ×450 (Б).

Таблица 1

Изменения в структуре легких крыс через 13 недель после облучения в дозе 12 Гр

Характер изменений	Объем ткани (%)		
	Облучение	Облучение+БОЛ	<i>p</i>
Сохранение структуры	39±1,1	54±1,4	<0,001
Альвеолит	26±0,9	21±1,0	<0,05
Очаги дистелектаза*	19±1,0	11±1,3	<0,05
Интерстициальный фиброз	14±0,9	12±1,0	>0,05
Очаговая бронхопневмония	2±0,4	2±0,3	>0,05

Примечание. * — выраженный дистелектаз со щелевидными полостями альвеол.

Через 13 недель после облучения в легком сохранялся очаговый характер нарушений кровообращения. Вокруг сосудов формировались периваскулярные клеточные муфты из лимфоидных элементов с примесью сегментоядерных лейкоцитов. Обращало на себя внимание значительное утолщение межальвеолярных перегородок с их инфильтрацией гистиогенными элементами, среди которых возрастало количество гистиоцитов, плазматических и тучных клеток. Увеличение дозы облучения до 14 Гр приводило к появлению очагов катарального бронхита с переходом воспалительного процесса с перибронхиальной ткани на прилегающие альвеолярные зоны. Очаги бронхопневмонии (с включением нескольких долек) наиболее часто располагались в прикорневых отделах органа. В зонах с инфильтративно-воспалительными изменениями происходило накопление рыхло расположенных коллагеновых волокон. При отсутствии вторичной инфекции развивающийся интерстициальный склероз ткани легкого носил диффузный характер.

Следовательно, через 13 недель в облученном легком на фоне альвеолита в продуктивной фазе его течения происходило формирование очагов пневмо-склероза.

Введение БОЛ не изменяло характер и последовательность становления радиоиндуцированных нарушений в структуре ткани легкого. Однако между лечеными и нелечеными животными наблюдаются отчетливые различия в выраженности и распространенности отдельных звеньев патологического процесса. Главным образом, это касается альвеолита как в отечной, так и продуктивной стадиях его развития (рис.1, а,б).

Для сравнительной оценки тяжести радиоиндуцированных изменений в легких подопытных крыс морфометрически исследовали материал через 13 недель после облучения в дозе 12 Гр. Основанием служит тот факт, что воздействие в этой дозе не приводило к нарушениям дренажной функции бронхов с присоединением вторичной инфекции и позволяло наиболее объективно оценить способность препарата к модификации лучевых повреждений самой ткани легкого. Результаты этих исследований представлены в табл.1.

Анализ данных показывает, что объем ткани, не имеющей признаков альтераций, либо с изменениями, не искажающими архитектуру воздушных зон органа, у леченных крыс достоверно превышает аналогичный показатель нелеченых животных ($p < 0,001$). Микроучастки очаговой бронхопневмонии и разрастание соединительной ткани в интерстиции легкого наблюдались одинаково часто в обеих экспериментальных группах. Вместе с тем не только выраженность, но и распространенность альвеолита в объеме легочной ткани были существенно меньшими у облученных крыс, получавших БОЛ ($p < 0,05$). В особую группу — «очаги дистелектаза» были выделены структурные нарушения, характеризующие тяжелую форму альвеолита с резким утолщением межальвеолярных стенок. При этом происходило почти полное спадение альвеол,

Таблица 2

Характер и распространенность (%) изменений в структурных элементах аэрогематического барьера через 13 недель после облучения в дозе 12 Гр

Характер изменений	Облучение	Облучение+БОЛ	<i>p</i>	
Альвеолоциты I типа	внутриклеточный отек, нарушение ультраструктуры	50±5,0	35±4,0	<0,05
Альвеолоциты II типа	дефицит популяции	40±4,9	25±3,0	<0,01
	разрушенные клетки внутри альвеол	30±4,6	15±3,0	<0,01
	липидная трансформация или исчезновение пластин в ОПТ	30±4,6	0±0,0	<0,001
	деформация пластинчатого комплекса ОПТ	50±5,0	45±4,0	>0,05
Утолщение базальной мембраны		30±4,6	30±4,6	>0,05
Эндотелиоциты капилляров	внутриклеточный отек, нарушение ультраструктуры	50±5,0	35±4,0	<0,05

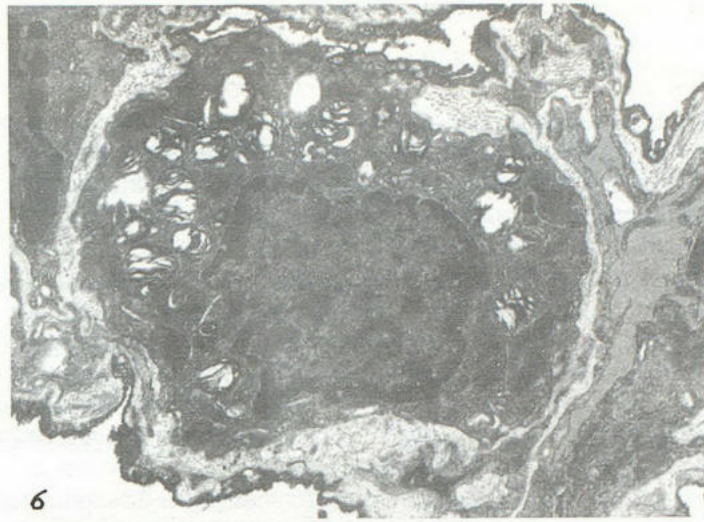
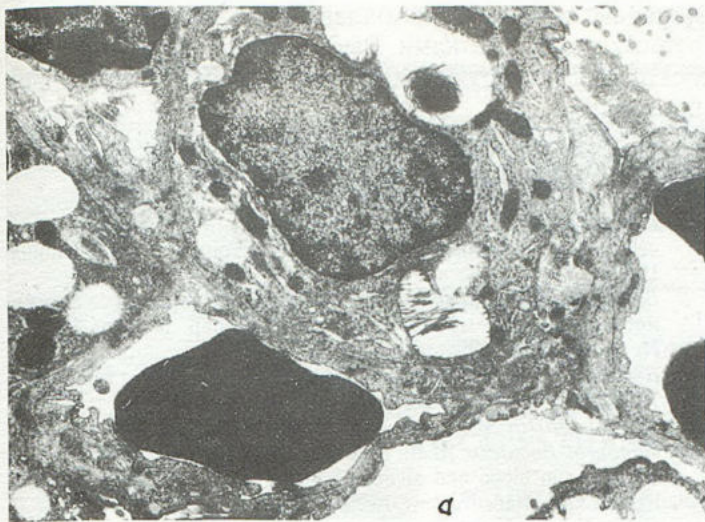


Рис.2. Альвеолоциты II типа через 13 недель после облучения в дозе 12 Гр (А) и последующего введения БОЛ (Б).

Увеличение размеров ОПТ с исчезновением пластин и образованием оптически пустых вакуолей у нелеченых крыс $\times 10\ 000$.

приводящее к нарушению дыхательной функции легкого с возможностью последующего возникновения инфекционно-воспалительных процессов. Было установлено, что у леченых крыс очаги дистелектаза встречались достоверно реже ($p < 0,05$), в связи с чем снижалась вероятность развития у эти животных гипоксемии и дыхательной недостаточности.

Влияние введения БОЛ на характер и распространенность радионуклидных изменений ультраструктуры межальвеолярных перегородок

Через 7 недель в межальвеолярных перегородках наблюдались явления отека, выраженность и распространенность которого зависели от дозы лучевого воздействия. Нарастание экссудации приводило к утолщению стенок альвеол, разрыхлению основного вещества и фибриллярных структур соединительной ткани. В строении эндотелия регистрировались изменения, свидетельствовавшие о нарушении их ультраструктурной организации и повышении сосудистой проницаемости. Альтерации в структуре альвеолярного эпителия характеризовались развитием внутриклеточного отека с нарушением в тонкой организации органелл. Радиоиндуцированные преобразования в популяции сурфактантпродуцирующих альвеолоцитов II типа (А-II) проводили как к дефициту численности этих элементов, так и к уменьшению в них количества осмиофильных пластинчатых телец (ОПТ). Нередко наблюдалось полное разрушение пластинчатых комплексов и превращение ОПТ в оптически пустые вакуоли. Поврежденные клетки альвеолярного эпителия и их фрагменты, наряду с активированными макрофагами, часто располагались в просветах альвеол. Клеточная инфильтрация интерстиция межальвеолярных перегородок носила очаговый характер.

Через 13 недель умеренно выраженные дистрофические изменения в альвеолоцитах и эндотелиоцитах капилляров в пределах стенки альвеолы носили мозаичный характер. В структурной организации межаль-

веолярных перегородок, наряду с зонами сохраняющегося интерстициального и внутриклеточного отека, нарастала инфильтрация септ клетками, типичными для хронического воспаления.

На фоне широкого спектра клеточных элементов соединительной ткани увеличивалась численность фибробластов с накоплением в локусах их расположения фибриллярных компонентов. Разрастание соединительной ткани в стенках альвеол не только снижало функциональные возможности аэрогематического барьера легкого, но и нарушало трофику его клеточных элементов, что усугубляло тяжесть первичного лучевого поражения эпителия альвеол и эндотелия капилляров.

С помощью морфометрического метода было проведено сопоставление групп подопытных животных по критерию распространенности в объеме ткани легкого признаков нарушений в ультраструктуре основных функциональных элементов аэрогематического барьера (табл.2).

Анализ представленных результатов показывает, что у леченных крыс повреждения в строении альвеолоцитов I типа, выстилающих полости альвеол, встречались реже, чем у нелеченных животных ($p < 0,05$).

Особое внимание было обращено на состояние сурфактантпродуцирующих клеток. У крыс, которым вводили препарат, альвеолы с фрагментами разрушенных А-II занимали вдвое меньшую площадь ткани легкого, чем у животных сравняемой группы ($p < 0,01$). Существенно снижался и уровень депопуляции А-II. Лучшая сохранность обнаружена и в структуре ОПТ альвеолоцитов. Так, если деформация пластин ОПТ у леченых животных встречалась столь же часто, как и у крыс облученного контроля, то дезорганизация этих структур в виде липидной трансформации либо их полное исчезновение не были выявлены (рис.2, а,б). Существенным моментом в ослаблении лучевого повреждения аэрогематического барьера после введения БОЛ являлась и меньшая поврежденность эндотелиальной выстилки в виде внутриклеточного отека с нарушениями ультраструктуры эндотелиоцитов.

Работами последних лет в области изучения механизмов острого повреждения легких при различных патологических состояниях (множественная травма, грамнегативный сепсис, передозировка лекарства, острое лучевое поражение и др.) выяснена важнейшая роль активации полиморфноядерных лейкоцитов, потока цитокинов, адгезивных молекул, эндотелинов, фактора некроза опухоли и др. [4,6,7]. Все эти факторы вносят вклад в развитие нарушений структуры и функции стенки альвеолы. Одним из компонентов этой структуры является СТ. Наряду с его основной функцией — снижением поверхностного натяжения на границе раздела фаз и связанной с ней антиателектатической активностью, он обладает также и выраженными защитными свойствами по отношению к клеточным элементам ткани легкого и иммунорегуляторными свойствами [10].

Можно предположить, что обнаруженное уменьшение лучевого поражения структурных элементов легочной ткани под действие липосом из ФХ и Хс связано как со свойствами самих липосом, так и с выявленными нами ранее увеличением синтеза СТ de novo [8]. Эта стимуляция синтеза СТ выявляется на 2—3—и сутки после введения липосом, то есть на ранних сроках поражения клеточных элементов при лучевом поражении, и, по-видимому, такое увеличение содержания СТ происходит в оптимальное для проявления его действия время. Как видно из представленных данных, наибольший эффект от введения липосом проявляется именно в уменьшении структурных нарушений в сурфактантпродуцентах А-II. Можно предположить, что иммунорегуляторные свойства СТ и, в частности, свойства гидрофильных сурфактантассоциированных белков группы А и Д, вносят вклад в уменьшение лучевого поражения легочной ткани. Возможно, захват липосом альвеолярными макрофагами и моноцитами

приводит к изменению баланса цитокинов, экскретируемых этими клетками. Высказанные предположения, безусловно, требуют дальнейшей экспериментальной проверки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Проблемы патогенеза и патолого-анатомической диагностики в аспектах морфометрии. — М.: Медицина, 1984.
2. Безрукова А.Г., Розенберг О.А. Определение параметров липосом методом спектра мутности // Бюл. exper. биол. — 1981. — № 4. — С.506—508.
3. Вейбель Э.Р. Морфометрия легких человека. — М.: Медицина, 1970.
4. Chollet-Martin S., Jourdain B., Gibert C., Elbim C., Chastre J., Gougerot-Pocidalo M.A. Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 1996. — Vol.154. — P.594—601.
5. Gross N.J. Inhibition of surfactant subtype convertase in radiation model of adult respiratory distress syndrome // Am. J. Physiol. — 1991. — Vol.260. — P.L311—L317.
6. Martin M.A., Silverman H.J. Gram-negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome // Clin. Infect. Dis. — 1992. — Vol.14. — P.1213—1228.
7. Pison U., Bock J.C., Pietschmann S., Veit S., Slama K. The adult respiratory distress syndrome: Pathophysiological concepts related to the pulmonary surfactant system // Surfactant Therapy for Lung Disease / Ed. B.Robertson, H.W.Taeusch. — New York: Marcel Dekker, 1995. — P.169—198.
8. Rosenberg O.A., Kirillov Yu.A., Danilov L.N., Loshakova L.V., Lebedeva E.S., Shulga A.E. The lung surfactant and immune system response to intratracheal administration of "empty" liposomes // J. Liposome Res. — 1994. — Vol.4, № 1. — P.203—212.
9. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol.77. — P.4194—4198.
10. Van Iwaarden J.F., Van Golde M.G. Pulmonary surfactant and lung defence: Interactions of surfactant proteins with phagocytic cells and pathogens // Surfactant Therapy for Lung Disease / Ed. B.Robertson, H.W.Taeusch. — New York: Marcel Dekker, 1995. — P.75—94.

Поступила 13.02.98.