

Е.А. ДЕВИНА, Т.Ю ПРИНЬКОВА, А.Д. ТАГАНОВИЧ

**ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ  
АКТИВНОСТИ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ КОНТАКТЕ  
С СИГАРЕТНЫМ ДЫМОМ**

*Белорусский государственный медицинский университет*

В Беларуси от болезней, связанных с курением, ежегодно умирают более 15 тысяч человек. В первую очередь, воздействию табачного дыма подвергается бронхо-легочная система, поэтому курение табака является одной из наиболее важных причин хронических неспецифических болезней легких, таких как хронический бронхит, эмфизема легких, бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) [9,10].

Среди активных факторов неспецифической защиты бронхо-легочной системы важное место занимают высокодифференцированные клетки легких – альвеолярные макрофаги (АМ). Способность АМ поглощать чужеродный материал тесно связана с их жизнеспособностью (ЖС) и является одним из показателей их функционального состояния.

Находясь на поверхности воздухо-проводящих путей, АМ продуцируют оксид азота ( $\text{NO}^{\bullet}$ ). Он образуется под действием фермента — NO-синтазы (NOS) в результате окисления L-аргинина. В альвеолярных макрофагах показано существование двух типов NOS, при этом базальный уровень синтеза обеспечивается эндотелиальной изоформой - eNOS, а увеличение продукции оксида азота после экспозиции к воспалительным стимулам обеспечивает индуцибельная изоформа (iNOS).  $\text{NO}^{\bullet}$  обладает микробицидным действием не только на вне-, но и на внутриклеточные патогенные агенты, действуя посредством образования высокореакционных форм, например пероксинитрита ( $\text{ONOO}^{-}$ ) или радикалов диоксида азота

(NO<sub>2</sub>) [3,13]. Кроме того, оксид азот является уникальным медиатором межклеточных взаимодействии [4]. Исходя из этого обстоятельства, предполагается, что изменения метаболизма и функциональной активности АМ в условиях воздействия сигаретного дыма лежат в основе патогенеза хронического воспаления легочной ткани [9].

В литературе широко обсуждается влияние сигаретного дыма на функции клеток лёгких, в том числе, альвеолярных макрофагов [11,12,17]. Однако до настоящего времени не определена динамика взаимодействия сигаретного дыма с макрофагами лёгких, отсутствует оценка жизнеспособности этих клеток в целом, в данных условиях. Отсутствуют сведения и об изменении метаболитов оксида азота, продуцируемого альвеолярными макрофагами.

Поэтому целью данного исследования явилось изучение влияния экстракта сигаретного дыма (ЭСД) на жизнеспособность альвеолярных макрофагов, их фагоцитарную активность и способность к генерации оксида азота.

### **Материалы и методы**

Эксперимент был проведен на 20 беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, находящихся на стандартном рационе вивария БГМУ. Альвеолярные макрофаги (АМ) получали из бронхо-альвеолярной лаважной жидкости. Клеточную суспензию центрифугировали (900 об/мин, 10 мин, +4°C). Полученный клеточный осадок ресуспендировали в модифицированной Дульбекко культуральной среде Игла (DMEM) (Sigma, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, 2 мМ глутамина (Sigma, США), гентамицин (Борисовский завод медпрепаратов, РБ). Общее количество клеток подсчитывалось в камере Горяева. Клеточную суспензию высевали на пластиковые чашки Петри («МиниМед», РФ) диаметром 3,5 см в конечной концентрации  $2 \times 10^6$  макрофагов на чашку и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (t = 37°C, увлажненная атмосфера, 5% CO<sub>2</sub>) на 45 мин.

Экстракт сигаретного дыма (210 мг%) был приготовлен путем пропускания дыма из трёх сигарет («Корона», РБ; содержание смол в 1 сигарете – 14 мг) со скоростью 1 сигарета/мин через 20 мл культуральной среды DMEM с использованием вакуумного насоса. Культуральная среда с концентрации ЭСД 140 мг% и 70 мг% готовилась путем разведения исходного экстракта. ЭСД-среду стерилизовали с помощью бактериального фильтра (Sigma, США), ( $\varnothing$  пор=0,22 мкм) pH 7,4.

АМ, адгезированные к пластиковой поверхности, инкубировали с ЭСД с концентрацией смол 70, 140 и 210 мг% в культуральной среде DMEM в течение 1 ч и 24 ч ( $t=37^{\circ}\text{C}$ , увлажненная атмосфера, 5%  $\text{CO}_2$ ).

По истечении срока инкубации определяли способность макрофагов поглощать *Staphylococcus aureus*. Определяли фагоцитарное число (ФЧ) - среднее число микроорганизмов, поглощенных одним активным АМ, и фагоцитарный показатель (ФП) – % фагоцитирующих клеток из числа сосчитанных макрофагов.

Жизнеспособность альвеолярных макрофагов определялась по исключению клетками трипанового синего (Sigma, США). Подсчёт клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа (ЛОМО, РФ). Из числа АМ, не воспринявших окраску из 100 макрофагов, рассчитывали % жизнеспособности.

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (КФ 1.1.1.27) в среде культивирования измеряли спектрофотометрически с использованием набора реагентов («Анализ-Х», РБ).

Генерацию оксида азота оценивали путём определения концентрации нитритов в среде инкубации и в АМ, с помощью реактива Грисса – спектрофотометрически [2].

Статистическую обработку проводили с использованием программного пакета Statistica 6.0. Все результаты представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. Статистическая значимость полученных

результатов была оценена при помощи U-теста Манна – Уитни для непараметрических выборок. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### **Результаты**

Через 1 ч инкубации ЖС альвеолярных макрофагов в контрольных пробах составила 98%. Спустя этот же период времени, когда клетки инкубировали в присутствии ЭСД, жизнеспособность АМ уменьшилась. (рис.1). При концентрации смол 70 мг% она составила 92%, 140 мг% – 86 и 210 мг% – 83%. Разница по сравнению с контролем во всех случаях статистически достоверна.

Через 24 ч инкубации степень снижения жизнеспособности АМ под влиянием смол сигаретного дыма была интенсивнее. Жизнеспособность составила при концентрации 70 мг% – 75%, 140 мг% – 71%, 210 мг% – 65%. В контрольных пробах жизнеспособность клеток была, в среднем, 93%.

Присутствие в среде инкубации АМ смол сигаретного дыма увеличивало активность ЛДГ (Рис.1, 2). При повышении концентрации смол с 70 мг% до 140 мг% и 210 мг% уровень высвобождения ЛДГ из АМ через 1 ч возрос до 8%, 14,1% и 17,4%, соответственно. При экспозиции АМ в ЭСД-среде в течение 24 ч активность ЛДГ в среде инкубации ещё больше увеличилась. В чашках, в которых присутствовал ЭСД с концентрацией смол 210 мг%, активность ЛДГ в среде инкубации увеличилась в наибольшей степени, в 2,5 раза по сравнению с контрольным уровнем.

Выявлена корреляционная зависимость между показателем ЖС и активностью ЛДГ в культуральной среде (коэффициент корреляции  $r$ , подсчитанный по Спирмену составил - 0,9;  $p < 0,005$ ).

ЭСД подавлял фагоцитарную активность АМ уже при минимальной концентрации смол сигаретного дыма в культуральной среде. Увеличение концентрации смол в ЭСД до 140 мг%, а затем до 210 мг% приводило к достоверному снижению ФП на 22,3% и 29,7%, соответственно (таб.1). При инкубации АМ в ЭСД-среде в течение 24 ч фагоцитарный показатель уменьшился на 7,4% (концентрация смол СД 70 мг%), на 29,7%

(концентрация смол СД 140 мг%) и на 40,8% (концентрация смол СД 210 мг%) по сравнению с контролем.

Эксперименты по изучению влияния ЭСД на величину другого критерия, характеризующего поглотительную способность АМ, фагоцитарное число, показали, что оно также уменьшается, в среднем, на 16,3% в сравнении с контролем при всех изучаемых концентрациях ЭСД и независимо от времени экспозиции (таб. 1).

В культуральной среде, содержащей ЭСД, в которой не инкубировались клетки, концентрация нитрит-ионов увеличивалась (таб. 1). Причём, с ростом концентрации смол сигаретного дыма возрастал и уровень нитрит-ионов. К примеру, при концентрации смол 70 мг% медиана его составила 7,8 мкмоль/л, а при концентрации смол 210 мг% она была в 2,5 раза больше – 18,1 мкмоль/л. Через 24 ч инкубации культуральной среды (без клеток) с ЭСД образование нитрит-ионов ещё больше увеличилось, от отсутствия их в контрольных пробах (без добавления ЭСД) до 21,6 мкмоль/л, если в среде присутствовал ЭСД с концентрацией смол 210 мг% .

Через 1 ч инкубации АМ с ЭСД наблюдалось снижение концентрации нитрит-ионов в культуральной среде, по сравнению с бесклеточным уровнем, на 32% при концентрации смол 70 мг%, на 38% при 140 мг% и на 52%, если концентрация смол в ЭСД составила 210 мг%.

Содержание нитрит-ионов через 1 ч инкубации в самих АМ в контрольных пробах было наибольшим ( $2,1 \text{ нмоль}/10^6$  клеток). Присутствие в среде инкубации ЭСД приводило к снижению уровня этого показателя, при концентрации смол 210 мг% он был наименьшим ( $1,1 \text{ нмоль}/10^6$  клеток) и статистически достоверно отличался от контрольного.

Через 24 ч инкубации АМ с ЭСД концентрация нитрит-ионов в клетках также была существенно ниже, чем в контроле. Однако наименьшей она была в случае инкубации с ЭСД с концентрацией смол 70 мг%. С увеличением концентрации смол степень снижения имела тенденцию к уменьшению (таб. 1).

## Обсуждение

Основным компонентом табачного дыма, определяющим его токсичность, является смола или твердая фаза [12]. Поэтому избрание в качестве критерия потенциальной токсичности концентрации смол в табачном дыме представлялось вполне обоснованным. Использование в экспериментах ЭСД с различным содержанием смол и длительностью их воздействия на АМ позволило определить не только направленность внутриклеточных изменений показателей функциональной активности и метаболизма, но и её динамику.

Падение жизнеспособности клеток под влиянием смол сигаретного дыма не явилось неожиданностью. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* ряд исследователей отмечали индуцированный воздействием сигаретного дыма апоптоз альвеолярных макрофагов крыс и моноцитов крови человека [12]. А Julie A. Wickenden и соав. описали вызванный конденсатом сигаретного дыма некроз в альвеолярных эпителиальных клетках и эндотелиальных клетках пупочной вены [15].

Результаты проводимого нами исследования продемонстрировали, что снижение жизнеспособности АМ и сопряжённый с этим рост активности ЛДГ в среде инкубации АМ зависят от количества смол и длительности их контакта с клетками. Общеизвестно, что выход цитозольного фермента – ЛДГ в окружающее пространство происходит вследствие нарушения целостности клеточных мембран. Поэтому увеличение активности ЛДГ в среде инкубации АМ по мере повышения там концентрации смол и продолжительности их совместной с клетками инкубации подтверждает факт прогрессирующих нарушений целостности мембранных структур и гибели клеток.

Очевидно, что уменьшение жизнеспособности АМ под влиянием смол сигаретного дыма не может не сказаться на их функциональной активности. Полученные в ходе исследования данные показывают, что доля фагоцитирующих макрофагов уменьшается по мере нарастания

концентрации смол в среде инкубации АМ. Причём, наиболее выраженное изменение, примерно в 2 раза, имеет место при самой высокой из изучаемых концентраций смолы (210 мг%) и при наиболее продолжительном контакте с ней АМ (24 ч). Несколько по иному изменяется поглотительная эффективность АМ, о чём свидетельствует фагоцитарное число. Спустя 24 ч инкубации клеток с ЭСД количество поглощённых *St. aureus* уменьшается, но степень уменьшения не зависит при этом от концентрации смолы.

Снижение интенсивности фагоцитоза под влиянием смол сигаретного дыма отмечалось ранее и другими исследователями [11].

Важнейшим регулятором фагоцитарной активности АМ является оксид азота. В литературе имеются противоречивые данные об уровне продукции оксида азота клетками легких при экспозиции их сигаретным дымом [6,8]. При этом не оценивалась динамика изменения метаболизма NO.

Полученные данные убедительно показывают наличие в смоле сигаретного дыма значительного количества оксида азота, которое существенно превышает его эндогенный уровень в АМ. В этих условиях контакт ЭСД с клетками приводит к снижению концентрации нитрит-ионов в среде инкубации, о чём свидетельствуют результаты сравнения уровня этого показателя в среде инкубации без клеток и с клетками. Хотя в среде, в которой АМ инкубировались при большей концентрации смолы, уровень нитрит-ионов выше, чем в среде, в которой инкубировались клетки при меньшей концентрации смолы. Характерно, что в результате контакта со смолами сигаретного дыма концентрация нитрит-ионов в самих АМ снижалась, причём, тем больше, чем выше была концентрация смолы в среде инкубации.

Однако, такая закономерность имела место только при относительно коротком периоде инкубации АМ с сигаретным дымом. При продолжительной экспозиции клеток с ЭСД значительное снижение концентрации нитрит-ионов также имело место, но в наибольшей степени при минимальной концентрации смолы. Возможно, последнее

обстоятельство, было обусловлено проникновением NO или его конечного метаболита – нитрит-иона обратно из среды инкубации в клетки вследствие нарушенной проницаемости. Аргументом в пользу такого предположения является вышеописанная зависимость жизнеспособности АМ от контакта с ЭСД.

Есть основание полагать, что причиной снижения уровня нитрит-ионов в АМ под влиянием ЭСД является уменьшение их продукции из-за угнетения активности NO-синтазы. Было показано, что инкубация эндотелиальных клеток лёгочной артерии с ЭСД в течение 24 ч снижает активность этого фермента, и угнетение носило дозозависимый характер [16]. Авторы предположили, что снижение активности фермента обусловлено прямым ингибирующим действием высокой концентрации NO в сигаретном дыме на активный центр NO-синтазы, содержащий гемовое железо. Однако, подобное обстоятельство не объясняет, почему в присутствии АМ концентрация нитрит-ионов, поступающих со смолами сигаретного дыма, эффективно уменьшается, от первоначального уровня, имевшегося в бесклеточной ЭСД-среде, что демонстрируют полученные нами результаты.

Таким образом, предпринятое исследование позволило раскрыть некоторые закономерности изменения жизнеспособности, фагоцитарной активности АМ и генерации оксида азота в этих клетках под влиянием смол сигаретного дыма, которые можно сформулировать следующим образом:

1. При инкубации с ЭСД снижается жизнеспособность изолированных АМ и нарушается структурная целостность их мембран.
2. Контакт с ЭСД снижает поглотительную способность АМ как за счет количества клеток, осуществляющих фагоцитоз, та и за счет эффективности поглощения чужеродного материала фагоцитирующими клетками.
3. Смола сигаретного дыма содержит высокие концентрации NO и изменяет метаболизм оксида азота в АМ, снижая внутриклеточный уровень нитрит-ионов.



4. Обнаруженные изменения становятся более выраженными при нарастании концентрации смолы в ЭСД и длительности контакта с ней АМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда Фундаментальных Исследований НАН Беларуси.

### **Литература**

1. Билеико М.В. //Медицина, М. 1989. С. 367-381.
2. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. //Клиническая лаб.диагностика. 2004. № 1. С. 13-15.

3. Дмитренко Н.П.// Украинск. биохимич. журнал. 2005. Т.77, № 5. С. 5-22.
4. Сепиашвили Р.И., Шубич М.Г., // Астма. 2001. Т. 2, № 2. С. 5-14.
5. Чучалин, А.Г.// Белая книга. Пульмонология . 2004. № 1.С. 7–34.
6. Balint B, Donnelly L.E. // Thorax. J. 2001. Vol. 56. P.456–461.
7. Chambers,W S Tunnicli V. // Thorax. J. 1998. Vol. 53. P. 677–679.
8. Deborah H. Yates. // Am J Respir Crit Care Med. 2001.Vol. 164. P. 1043–1046.
9. Delclaux. C. // Eur. Respir. J. 2003. Vol. 22. P. 10S–14S.
10. Eisner MD, Balmes J. // Environ Health Perspect. J. 2005. Vol. 4. P. 715-730.
- 11.Green G., Carolin D. // Engl. J Med. 1987. Vol. 276. P. 421-427.
12. Kazutetsu Aoshiha. // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001. Vol. 281. P.1392- 1401.
13. Kharitonov S. // Am J Respir Crit Care Med. 2001. Vol.163. P. 1693–1722.
14. Nooper C. E. //Biochim. Biophys. Acta. 1999. 1411. N 2–3. P. 290–309.
15. Wickenden J. // Am J of Resp Cell and Molec. Biol. 2003.Vol. 29. P. 562-570.
16. Yunchao Su, Weihong Han. // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998. Vol. 19. N5. P. 819-825
17. Willhite C. // J Carcinogenesis. 2001. Vol. 22, N. 8. P. 1173-1178,

УО «Белорусский государственный медицинский университет»  
220116 г. Минск, пр-т Дзержинского, 83  
тел. 272-67-88

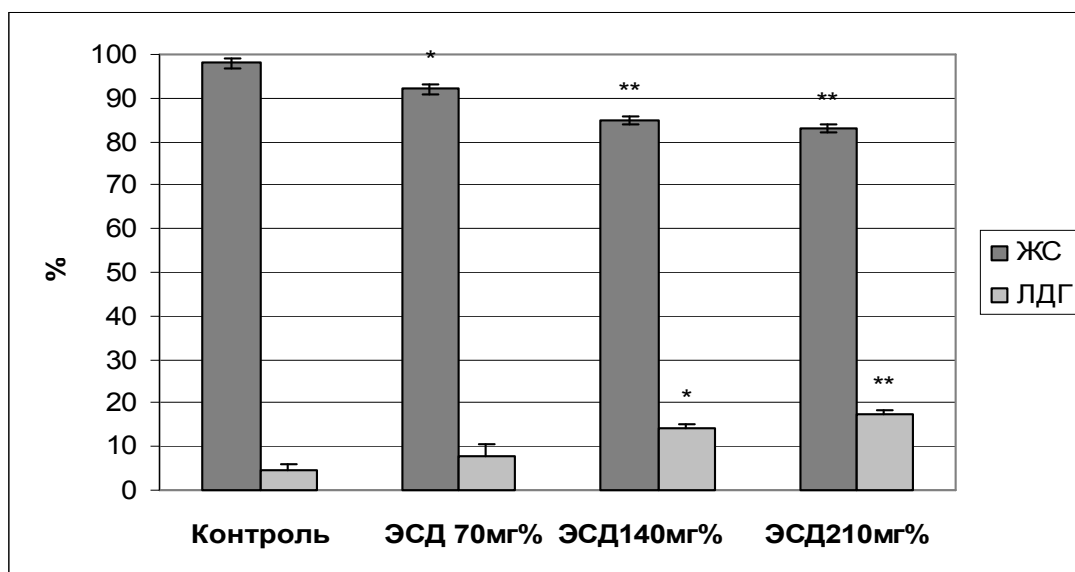


Рис. 1. Влияние ЭСД на жизнеспособность АМ и высвобождение ЛДГ в среде инкубации (%). Длительность инкубации – 1 ч.

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем. \*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с 70 мг% ЭСД-средой; для каждого показателя  $n=6$ .

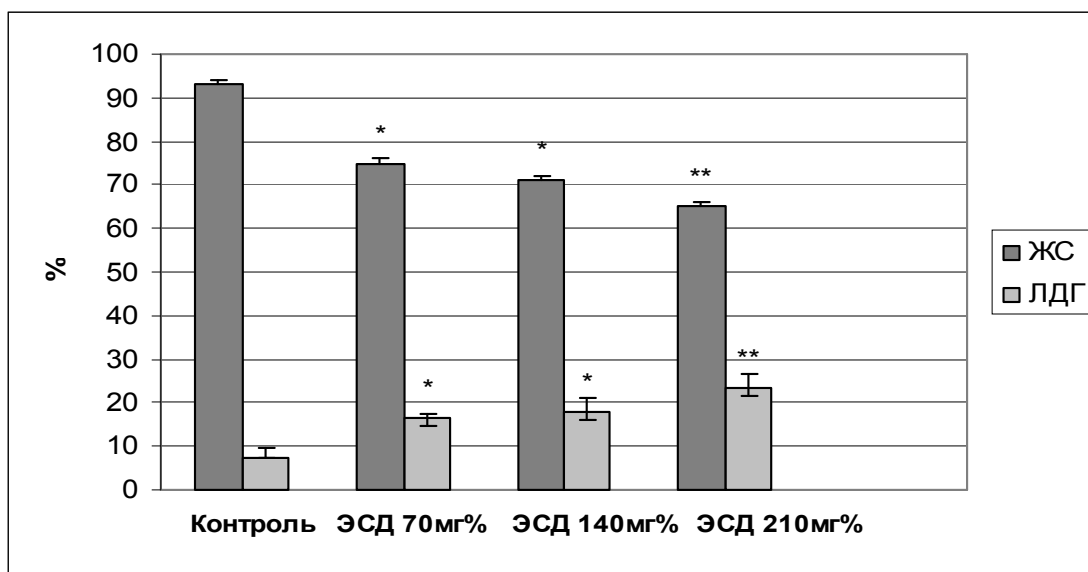


Рис. 2. Влияние ЭСД на жизнеспособность АМ и высвобождение ЛДГ в среде инкубации (%). Длительность инкубации – 24 ч.

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем. \*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с 70 мг% ЭСД-средой; для каждого показателя  $n=6$ .

**Таблица 1****Влияние экстракта сигаретного дыма (ЭСД) на фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов и концентрацию нитрит-ионов**

Показатель	Контроль	ЭСД 70 мг%	ЭСД 140 мг%	ЭСД 210 мг%
Продолжительность инкубации 1 ч				
Фагоцитарный показатель	31,0 (30,0-32,0)	27,0 * (25,0-29,0)	21,0** (19,0-23,0)	19** (18,0-21,0)
Фагоцитарное число	3,7 (3,3-4,2)	3,5 (3,3-3,7)	3,1* (2,7-3,5)	3,0* (2,6-3,3)
Внутриклеточный уровень нитрит-ионов, нмоль/10 <sup>6</sup> кл.	2,1 (1,7-2,3)	1,9 (1,6-1,9)	1,6 (1,6-1,7)	1,1* (1,0-1,2)
Концентрация нитрит-ионов в среде инкубации мкмоль/л	-	7,8* (6,9-8,5)	12,0* (11,0-13,2)	18,1* (16,8-22,0)
Концентрация нитрит-ионов в среде инкубации (с клетками) мкмоль/л	1,6 (1,1-2,4)	5,3 <sup>Δ</sup> (4,0-6,4)	7,4 <sup>ΔΔ</sup> (5,6-9,1)	8,6* <sup>Δ</sup> (6,5-10,7)
Продолжительность инкубации 24 ч				
Фагоцитарный показатель	31,0 (30,0-32,0)	25* (21,0-28,0)	19,0** (18,0-21,0)	16** (14,0-19,0)
Фагоцитарное число	3,7 (3,5-4,0)	3,1* (2,8-3,3)	3,1* (2,8-3,5)	3,1* (2,8-3,4)
Внутриклеточный уровень нитрит-ионов, нмоль/10 <sup>6</sup> кл.	4,4 (4,3-4,5)	1,8* (1,6-2,0)	2,7* (2,6-2,8)	2,9* (2,7-3,1)
Концентрация нитрит-ионов в среде инкубации мкмоль/л	-	17,3 (16,8-18,2)	18,6 (17,7-22,0)	21,6 (19,8-23,1)
Концентрация нитрит-ионов в среде инкубации (с клетками) мкмоль/л	5,1 (4,5-5,3)	8,7 <sup>Δ</sup> (6,8-10,5)	6,8 <sup>ΔΔ</sup> (5,2-8,3)	7,4* <sup>Δ</sup> (5,6-9,1)

Примечание: Данные представлены как медиана и 50% интерквартильный размах — между 25-й и 75-й процентилями ( $n=10$ ) \* $-p < 0,05$  по сравнению с контролем. \*\* $-p < 0,05$  по сравнению с 70мг% ЭСД; <sup>Δ</sup> $-p < 0,05$  по сравнению с 70мг% ЭСД - средой(без клеток); <sup>ΔΔ</sup> $-p < 0,05$  по сравнению с 140мг% ЭСД - средой(без клеток); \*<sup>Δ</sup> $-p < 0,05$  по сравнению с 210мг% ЭСД - средой(без клеток);

**Е. А. Девина, Т.Ю. Принькова, А.Д. Таганович**

**ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ  
АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ КОНТАКТЕ С СИГАРЕТНЫМ ДЫМОМ.**

**Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь**

**Резюме**

Изучено влияние сигаретного дыма на жизнеспособность альвеолярных макрофагов (АМ), фагоцитоз *St. aureus* и продукцию оксида азота этими клетками. АМ выделяли из бронхо-альвеолярной лаважной жидкости крыс. После инкубации АМ с экстрактом сигаретного дыма в течение 1 ч и 24 ч наблюдалось дозозависимое снижение жизнеспособности и фагоцитарной активности в сравнении с контрольными значениями. Снижение поглотительной способности АМ наблюдалось как за счет фагоцитарного показателя АМ, так и за счет числа поглощенных частиц. Установлено дозозависимое влияние экстракта сигаретного дыма и на продукцию оксида азота АМ. Обнаружено значительное снижение нитрит-ионов в АМ, находящихся в контакте с ЭСД и в среде инкубации по сравнению с контролем.

**E.A. Devina, T. Y. Prinkova, A.D. Tahanovich**

**CHANGES OF FUNCTIONAL ACTIVITY ALVEOLAR MACROPHAGES EXPOSED  
TO SIGARETTE SMOKE**

**Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus**

**Summary**

We studied the effect of exposure to cigarette smoke extract (CSE) on the viability, phagocytosis of *St. aureus* and NO-generation by alveolar macrophages (AM). AM were isolated from bronchoalveolar lavage fluid of rats. After the incubation with CSE for 1 h and 24 h AM showed a decreased viability and capacity to phagocytosis in dose-dependent manner compared to AM which were incubated without CSE. It has been observed the inhibition the phagocytic index of the AM and also the quantity of *St. aureus* absorbed by these cells by phagocytosis. CSE influenced the NO-production of AM. We found a significantly of nitrite concentration in AM which were subjected to CSE and in the medium where the cells were incubated.

УДК

**Девина Е. А., Принькова Т. Ю., Таганович А. Д. Особенности изменения функциональной активности альвеолярных макрофагов при контакте с сигаретным дымом**

Изучено влияние экстракта сигаретного дыма (ЭСД) с различной концентрацией смол на жизнеспособность альвеолярных макрофагов (АМ), фагоцитарную активность и генерацию оксида азота этими клетками. Установлено снижение жизнеспособности и фагоцитарного показателя альвеолярных макрофагов, выраженность которого зависит от концентрации смол в экстракте сигаретного дыма, контактировавших с клетками в течение 1 ч и 24 ч. При этом среднее количество микробных тел, поглощаемых одной фагоцитирующей клеткой снижалось вне зависимости от концентрации ЭСД и времени экспозиции. Отмечено значительное снижение концентрации нитрит-ионов в АМ и среде их инкубации под влиянием ЭСД.

Табл. 1. Ил. 2. Библиогр.- 17 назв.