

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

**ВЛИЯНИЕ СИГАРЕТНОГО ДЫМА НА КОМПОНЕНТЫ
ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В
АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГАХ**

Белорусский государственный медицинский университет

В норме в лёгочной ткани активные формы кислорода (АФК), образуемые нейтрофилами, эозинофилами и АМ, являются важным элементом резистентности организма, так как обладают антибактериальными и противоопухолевыми свойствами. Свободные радикалы принимают участие также в реакциях детоксикации ксенобиотиков, биоэнергетических процессах, межклеточных взаимодействиях [10].

Оксиданты, в первую очередь АФК, играют ключевую роль в молекулярных механизмах патогенеза различных заболеваний легких [12]. Известно, что легочная ткань непосредственно контактирует с кислородом, содержащимся в воздухе, а также с оксидантами окружающей среды и сигаретного дыма (СД). Курение является одним из наиболее агрессивных факторов в развитии хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Альвеолярным макрофагам (АМ) в связи с локализацией и наличием сильных эффекторных свойств отводится центральная роль в развитии бронхо-лёгочной патологии.

Показано, что в СД содержится высокая концентрация (10^{14} – 10^{16} спинов на грамм смолы) свободных радикалов, при этом, в твердой фазе СД находятся относительно стабильные «долгоживущие» гидроксиминоновые радикалы, способные, в свою очередь, генерировать супероксидный радикал (O_2^{\cdot}), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}) и пероксид водорода (H_2O_2). В газовой фазе преобладают короткоживущие радикалы – алкилы и пероксилы [8]. Активные формы кислорода при нахождении в альвеолярном пространстве

способны индуцировать системные процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран, способствующие их дисфункции, деградации структурной целостности и барьерных свойств, а также приводить к нарушениям различных рецепторных, ионообменных и метаболических функций клетки. ПОЛ-индуцирующая способность различных АФК неоднозначна и находится в обратной зависимости от продолжительности их жизни ($\text{HO}\cdot < \text{O}_2\cdot < \text{H}_2\text{O}_2$) и прямой зависимости от их диффузионной способности [6]. Таким образом, для суждения о состоянии свободнорадикальных процессов в любых клетках, в том числе, в АМ, важна оценка продуктов ПОЛ. Увеличение в клетке концентрации малонового диальдегида и родственных ему соединений, определяемых по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), считается классическим маркером окислительного стресса.

Внутриклеточная защита от свободных радикалов осуществляется функционированием антиоксидантной системы (АОС), включающей в себя ферментативное звено, а также растворимые антиоксиданты неферментативной природы. Одним из основополагающих критериев эффективности АОС является баланс ферментативной активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (Кат) и глутатионпероксидазы (ГП). СОД является основным ингибитором образования $\text{O}_2\cdot$, катализируя реакцию дисмутации $\text{O}_2\cdot$ в H_2O_2 . Восстановление H_2O_2 до воды в клетках происходит в реакции, катализируемой каталазой. В присутствии ионов двухвалентного железа H_2O_2 разлагается с образованием гидроксильного радикала ($\text{OH}\cdot$). Снижение уровня H_2O_2 приводит и к снижению концентрации $\text{OH}\cdot$.

Снижение активности одного из ферментов может привести к избыточному накоплению АФК. Предполагается, что СД способен инициировать оксидативный стресс, который возникает в результате дисбаланса в системе «оксиданты-антиоксиданты», и может играть ключевую роль в развитии патологического процесса в легочной ткани [9].

В литературе имеются противоречивые сведения об изменении активности ферментов антиоксидантной защиты в условиях воздействия СД. Так, было зарегистрировано повышение активности MnSOD в гомогенате легких крыс после экспозиции сигаретным дымом [13]. Другие исследователи наблюдали индуцированное сигаретным дымом угнетение активности каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы в гладкомышечных клетках сосудов [15].

В этой связи представлялось важным оценить состояние оксидантной/антиоксидантной системы АМ, так как именно данное звено клеточного метаболизма, предполагалось, будет максимально уязвимым в условиях воздействия сигаретного дыма.

Целью данного исследования явилось изучение влияния сигаретного дыма на продукцию АФК, уровень ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в альвеолярных макрофагах (АМ) в зависимости от концентрации смол в СД и длительности их воздействия.

Материалы и методы исследования. Альвеолярные макрофаги получали из бронхо-альвеолярной лаважной жидкости крыс. Для этого клетки осаждали путем центрифугирования (900 об/мин, 10 мин, +4°C). Полученный клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, 2 мМ глутамин (Sigma, США), гентамицин (Борисовский завод медпрепаратов, РБ). Общее количество клеток подсчитывалось в камере Горяева. Клеточную суспензию высевали на пластиковые чашки Петри диаметром 3,5 см в конечной концентрации 2×10^6 макрофагов на чашку и помещали в CO₂-инкубатор (t -37°C, увлажненная атмосфера, 5% CO₂) на 45 мин.

Экстракт сигаретного дыма (ЭСД) 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 помощью вакуумного насоса. Концентрации 140 мг% и 70

мг% готовились путем разведения исходного экстракта. ЭСД-среду стерилизовали с помощью бактериального фильтра (Sigma, США), (Φ пор=0,22 мкм). ЭСД стандартизировали путем измерения оптической плотности ($OD\ 0,74\pm 0,05$) при $\lambda=320\text{нм}$, pH 7,4.

Альвеолярные макрофаги, адгезированные к пластиковой поверхности, инкубировали в течение 1ч и 24 ч с ЭСД, содержащим 70, 140 и 210мг% смол. По истечении данного времени инкубационную среду аккуратно снимали, а к клеткам добавляли изотонический раствор NaCl. АМ соскребали с поверхности чашек Петри скрепером (Costar, США), после чего клеточную суспензию разрушали методом гомогенизации вручную.

Активность свободнорадикальных процессов оценивалась на основании определения концентрации пероксида водорода, а также продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Состояние ферментативной антиоксидантной системы АМ оценивалось по уровню активности СОД, Кат и ГП.

Количество H_2O_2 определяли с использованием реакции окисления 3,3',5,5'- тетраметилбензидина пероксидазой из хрена (Sigma, США) [11]. Уровень ТБК-активных продуктов ПОЛ определяли спектрофотометрическим методом по цветной реакции между тиобарбитуровой кислотой и продуктами ПОЛ [2].

Активность СОД (КФ 1.15.1.1) измеряли с использованием набора реагентов («Анализ-Х», РБ) [3]. Активность фермента выражали в $E/10^6$ клеток.

Активность Кат (КФ 1.11.1.6) определяли спектрофотометрически с использованием метода, основанного на способности H_2O_2 образовывать окрашенный комплекс с солями молибдена [4]. Активность фермента выражали в $E/10^6$ клеток.

Активность ГП (КФ 1.11.1.9) определяли по скорости окисления глутатиона в присутствии гидроперекиси третичного бутила [5]. Концентрацию глутатиона до и после инкубации определяли

спектрофотометрически. Активность ГП выражали в нмоль Г-SH /мин /10⁶ клеток.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета Statistica 6.0. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи U-теста Манна – Уитни для непараметрических выборок. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты Совместная инкубация АМ с ЭСД (70 мг%) сопровождалась увеличением концентрации H₂O₂ как внутри клеток, так и в среде инкубации (рис. 1). Ещё больше повысился уровень H₂O₂ при использовании ЭСД с концентрацией смол 140 мг%. При самой высокой концентрации ЭСД – 210 мг% уровень пероксида водорода увеличился в 2,2 раза по сравнению с контролем.

Ещё более значительными изменения этого показателя были после инкубации АМ с ЭСД в течение 24 ч (рис. 1а). Так, при использовании ЭСД с концентрацией смол 210 мг% через 1 ч рост суммарного содержания H₂O₂ (внутри клеток и в среде инкубации) составил 200%, а спустя 24 ч инкубации – 340%. Аналогичные сдвиги наблюдались для уровня ТБК-активных продуктов в АМ (рис. 1, 1а).

Через 1 ч инкубации активность каталазы была значительно снижена по сравнению с контрольным значением (на 22, 51 и 71% соответственно), различия в сравнении с контролем статистически достоверны. Через 24 ч инкубации активность Кат под влиянием ЭСД снижалась до нулевого значения независимо от концентрации смол в ЭСД.

Уровень активности ГП был снижен через 1 ч инкубации при концентрации смолы 70 мг% – на 22 %, 100 мг% – на 39% и 210 мг% – на 64% ($p < 0,05$). При инкубации в течение 24 ч угнетение активности ГП вне зависимости от концентрации смол в ЭСД-среде, в среднем, составило 65%.

Снижение активности СОД в АМ отмечается уже через 1ч инкубации клеток в среде, обогащенной смолами табачного дыма: 70 мг% – на 16%, 140 мг% – на 24%, 210 мг% – на 30%. Различия с контролем статистически

достоверны. Еще более выраженное угнетение активности СОД происходило при инкубации в течение 24 ч, которое по мере увеличения концентрации смол в ЭСД-среде было соответственно ниже на 70%, 80%, и 86% контрольного значения (рис. 2, 2а).

Обсуждение. В отличие от других АФК, молекула H_2O_2 достаточно стабильна и не несёт электрического заряда, это позволяет ей свободно диффундировать через цитоплазматическую мембрану [1]. Поэтому для такого показателя его уровень измерялся как внутри АМ, так и в среде инкубации. Повсеместно имел место его рост в присутствии ЭСД, который был более выраженным по мере увеличения концентрации смол в ЭСД, и продолжительности инкубации. Эти данные, вместе с обнаруженным неуклонным нарастанием ТБК-активных продуктов в АМ в зависимости от дозы и длительности инкубации с ЭСД, свидетельствуют об увеличении образования АФК в альвеолярных макрофагах в результате контакта с сигаретным дымом. Такие же экспериментальные данные были получены в других лабораториях, с использованием моделей, отличных от применяемой в данной работе [9,16].

Наряду с увеличением образования, другой возможной причиной повышения концентрации H_2O_2 в АМ под влиянием сигаретного дыма является наблюдаемое нами снижение активности каталазы и глутатионпероксидазы, катализирующих расщепление пероксида водорода. Причём, взаимосвязь между АФК и антиоксидантными ферментами, похоже, носит реципрокный характер. Из литературы известно, что уровень активности внутриклеточных ферментативных антиоксидантов генетически детерминирован, при этом избыточное накопление в клетках супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$), или H_2O_2 сопровождается депрессией участков генома, ответственных за синтез и, следовательно, активность внутриклеточных антиоксидантных ферментов. Экспериментально показано, что накопление в среде H_2O_2 ведет к инактивации СОД [7]. Активности каталазы и СОД коррелируют между собой, что может

быть связано с переключением потока электронов с одной цепи транспорта на другую.

Регуляция активности ГП осуществляется изменением концентрации субстратов и коферментов. Сюда относятся глутатион (GSH) и НАДФН·Н⁺, биодоступность которых, в свою очередь, регулируется оксидантами [14]. Сообщают об активации пентозофосфатного пути и снижении уровня восстановленного глутатиона в эндотелиальных клетках, обработанных плазмой, экспонированной табачным дымом [18].

Хорошо известно, что избыток АФК ускоряет процесс перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот мембран клеток [6]. Обнаруженное нами повышение концентрации продуктов ПОЛ в АМ после контакта клеток с сигаретным дымом не только является следствием накопления АФК, но создает предпосылки для повреждения тканевых структур и усиления деструктивных процессов. Есть многочисленные экспериментальные доказательства способности продуктов ПОЛ непосредственно увеличивать ионную проницаемость липидного бислоя, в частности, для ионов водорода и кальция [1].

Таким образом, результаты проводимого исследования позволили выявить звенья окислительного стресса, который испытывают АМ в результате контакта с ЭСД. Повышение уровня пероксида водорода, ТБК-активных продуктов ПОЛ и угнетение функционирования ферментативной антиоксидантной защиты в АМ, скорее, носят деструктивный характер, направленный на снижение функциональной активности и жизнеспособности этой популяции клеток лёгких.

Выводы

1. Воздействие сигаретного дыма вызывает изменение интенсивности метаболизма в АМ, которое заключается в увеличении продукции АФК на фоне снижения активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты. В результате увеличивается интенсивность ПОЛ.

2. Выявленные изменения метаболизма в АМ зависят от концентрации смол в сигаретном дыме и длительности их воздействия на клетки легких. Исключением является угнетение активности Кат и ГП, которое не зависело от концентрации смол при длительном контакте АМ с экстрактом сигаретного дыма.

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

ВЛИЯНИЕ СИГАРЕТНОГО ДЫМА НА КОМПОНЕНТЫ ОКСИДАНТНО-Антиоксидантной системы в альвеолярных макрофагах

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Резюме

Сигаретный дым является основным источником оксидантов в легких, таких как свободные радикалы, включая гидроксикинон, гидроксильные радикалы и пероксид водорода. Был изучен оксидантно-антиоксидантный баланс в альвеолярных макрофагах (АМ) крыс под влиянием сигаретного дыма *in vitro*. АМ выделяли из бронхо-альвеолярной лаважной жидкости. Было отмечено значительное увеличение концентрации пероксида водорода и уровня ТБК-активных продуктов ПОЛ в АМ, находящихся в контакте с экстрактом сигаретного дыма (ЭСД) в течение 1 ч и 24 ч. Эти изменения сопровождались угнетением активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. Выявленный дисбаланс зависел от концентрации смол в ЭСД-среде и длительности инкубации клеток с ЭСД.

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

INFLUENCE OF CIGARETTE SMOKE EXTRACT ON OXIDANT/ANTIOXIDANT SYSTEM IN ALVEOLAR MACROPHAGES

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Summary

Cigarette smoke is a major source of oxidants, *e.g.* free radicals, including semiquinone, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide in lungs. An oxidants/antioxidants balance in rat alveolar macrophages under the influence of cigarette smoke was studied *in vitro*. AM were isolated from bronchoalveolar lavage fluid. The sharp increase of H₂O₂ concentration and the level of thiobarbituric acid reactive substances (which reflects lipid peroxidation) produced by AM after they were incubated for 1 and 24 hours in medium supplemented with cigarette smoke extract (CSE) were revealed. These changes were followed by the suppressed activity of superoxidedismutase, catalase and glutathionperoxidase. The revealed imbalance depends on tar concentration in CSE and duration of cell incubation with CSE.

Литература

1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский Образовательный Журнал. – 2000. – Т 6. – №12. – С. 13-19.
2. Гончаренко М.С. Метод оценки перекисного окисления липидов // Лаб. дело. – 1985. – Т. 1. – С. 60–61.
3. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кварцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36. – № 2. – С. 88–91.
4. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–17.
5. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 724–727.
6. Чекнев С.Б. Активные метаболиты кислорода в обеспечении и контроле естественных цитотоксических реакций // Вестник Российской академии медицинских наук. – 1999. – №2. – С.10-15.
7. Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 7 – С.29–36.
8. Ambrose JA., Barua R.S. The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease // Journal of Am College Cardiol. – 2004. – Vol .43(10). – P.1731-1737
9. Chow C. Cigarette smoking and oxidative damage in the lung // Ann NY Acad Sci USA. – 1993. – Vol. 686. – P. 289-298.

10. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82. – P. 47-95.
11. Gallati H. Horseradish peroxidase: kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H₂O₂ and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1985. – Vol. 23, № 8. – P. 453–460.
12. Halliwell B. Antioxidants in Human Health and Disease // *Ann. Rev. Nutr.* – 1996. – Vol. 16. – P. 33-50.
13. Kathleen A. Stringer. Particulate phase cigarette smoke increases MnSOD, NQO1, and CINC-1 in rat lungs // *Free Rad Biol & Med.* – 2004. – Vol. 37. – P.1527-1533.
14. Kondo T. Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages// *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1994. – Vol. 149. – P. 178–182.
15. Nishio Eisuke, Yasuhiro Watanabe. Cigarette smoke extract is a modulator of mitogenic action in vascular smooth muscle cells // *Life Sciences.* – 1998. – Vol. 62. – P. 1339-1347
16. Palozza P. Dual role of β-carotene in combination with cigarette smoke aqueous extract on the formation of mutagenic lipid peroxidation products in lung membranes: dependence on pO₂ // *Carcinogenesis.* – 2006. – Vol. 27(12). – P. 2383-2391.
17. Pietarinen-Runtti P. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2000. – Vol. 278. – P. 118–125.
18. Repine J.E. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1997. – Vol. 156. – P. 341-357

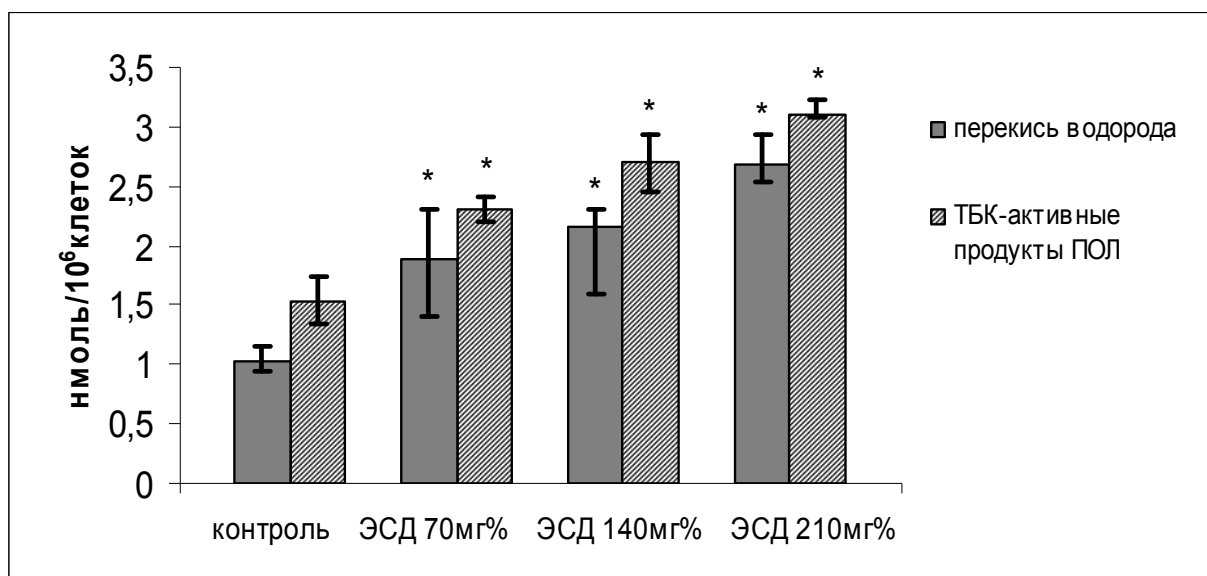


Рис. 1. Влияние ЭСД на концентрацию H_2O_2 и ТБК-активных продуктов ПОЛ в альвеолярных макрофагах. Продолжительность инкубации – 1 ч.
Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, для каждого показателя $n=6$.

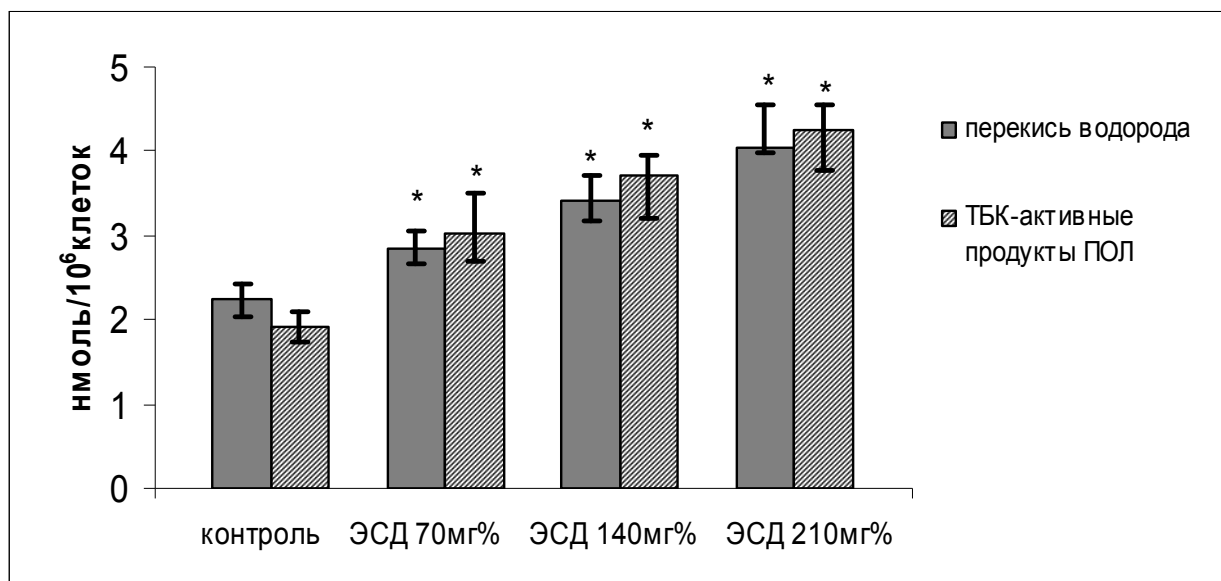


Рис. 1а. Влияние ЭСД на концентрацию H_2O_2 и ТБК-активных продуктов ПОЛ в альвеолярных макрофагах. Продолжительность инкубации – 24 ч.

Примечание: *— $p < 0,05$ по сравнению с контролем, для каждого показателя $n=6$.

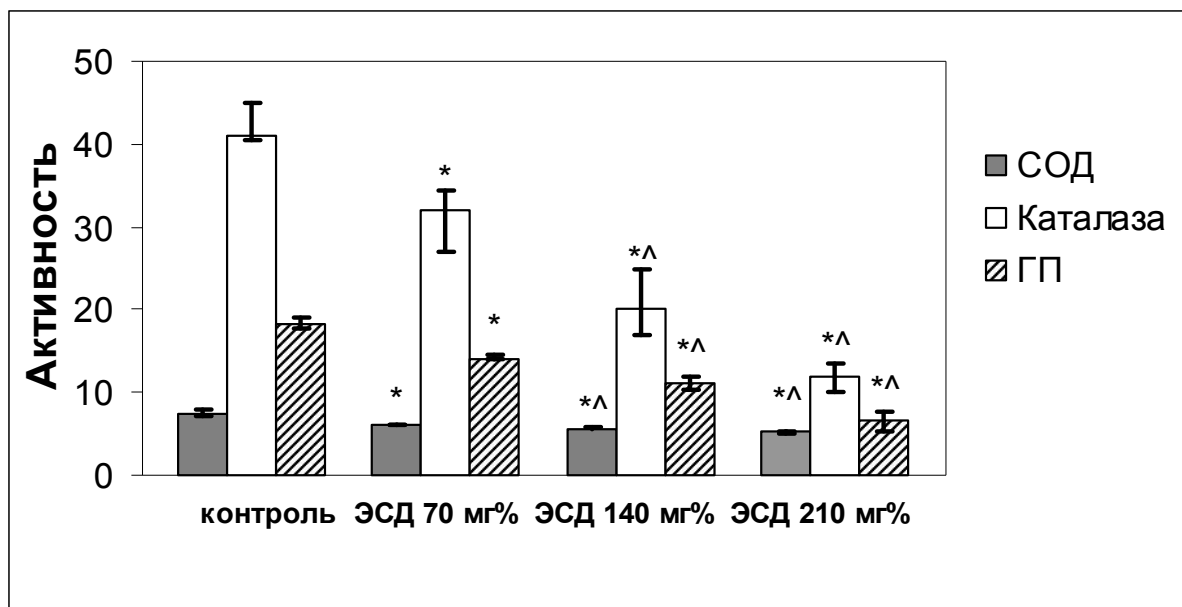


Рис. 2. Влияние ЭСД на активность СОД, Кат, ГП. Длительность инкубации – 1 ч.
 Примечание: *— $p < 0,05$ по сравнению с контролем, Δ — $p < 0,05$ по сравнению с ЭСД-средой 70 мг%, для каждого показателя $n=6$

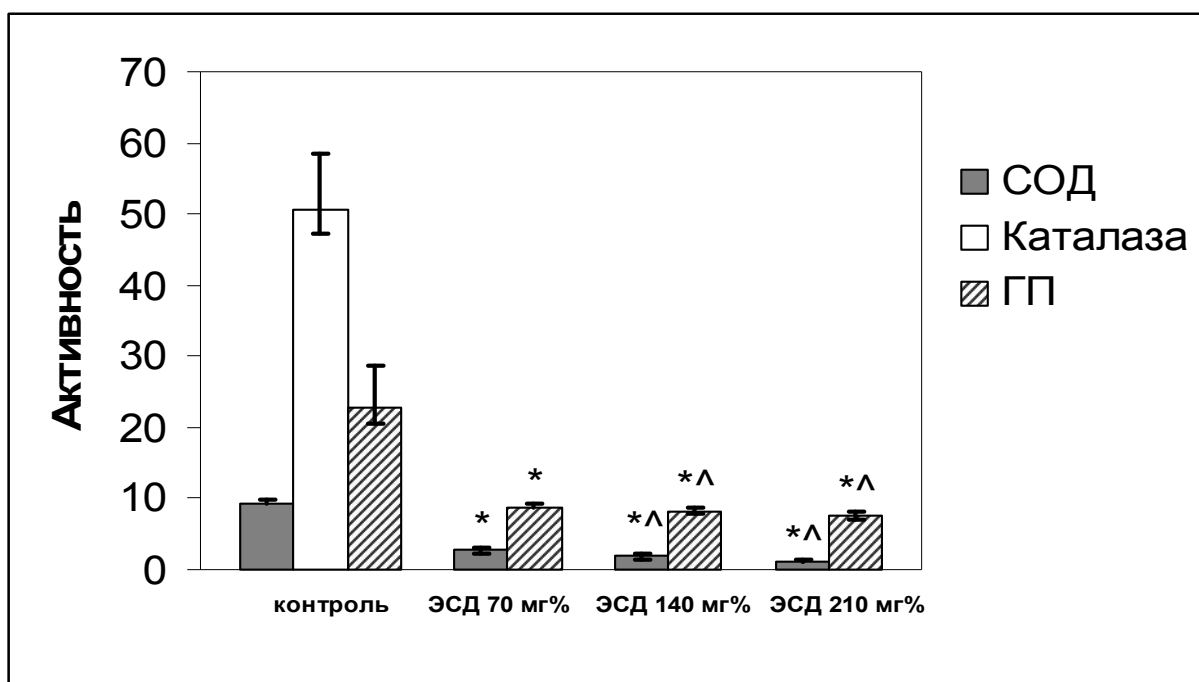


Рис. 2а. Влияние ЭСД на активность СОД, Кат, ГП. Длительность инкубации – 24 ч.
 Примечание: *— $p < 0,05$ по сравнению с контролем, [△]— $p < 0,05$ по сравнению с ЭСД-средой 70 мг%, для каждого показателя $n=6$

