

ЯДЕРНЫЙ ФАКТОР-КВ И СОСТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГАХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ СИГАРЕТНОГО ДЫМА

Девина Е.А., Таганович А.Д.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Работа посвящена выяснению роли альвеолярных макрофагов (АМ) в формировании воспалительной реакции, вызванной воздействием на легкие сигаретного дыма. Активируясь, АМ продуцируют в окружающее пространство активные формы кислорода (АФК) и медиаторы воспаления, синтез которых контролирует ядерный фактор-кВ (NF-кВ). Целью работы явилось исследование уровня NF-кВ и его регуляторов — компонентов оксидантно-антиоксидантного баланса в АМ в условиях воздействия сигаретного дыма *in vitro*. Выявлено увеличение концентрации пероксида водорода, ТБК-активных продуктов ПОЛ, карбонильных производных белков в АМ, контактирующих с сигаретным дымом. Эти изменения сопровождались угнетением ферментативной антиоксидантной системы, снижением уровня глутатиона и повышением содержания р65 NF-кВ в ядерной фракции АМ. Предполагается, что воздействие сигаретного дыма стимулирует увеличенную продукцию АФК и активацию NF-кВ с последующим синтезом провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: альвеолярные макрофаги, сигаретный дым, свободнорадикальный метаболизм, ядерный фактор-кВ.

Введение. Активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в молекулярных механизмах развития хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) [1]. Известно, что при вдыхании табачного дыма в легкие поступает 10^{14} – 10^{16} свободных радикалов на грамм смолы. Полагают, что в формировании воспалительного процесса в легких активное участие принимают альвеолярные макрофаги. В частности, эти клетки продуцируют повышенное количество АФК, способных непосредственно вносить вклад в повреждение легочной ткани или через регуляцию редокс-зависимых транскрипционных факторов и синтез провоспалительных цитокинов [2]. Одной из проблем современной медицины является установление взаимосвязи между кислородными радикалами и воспалительным процессом.

Ядерный фактор-кВ регулирует транскрипцию многих провоспалительных молекул, таких как фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкин-1 β , интерлейкин-6, макрофагальный воспалительный протеин-1 β , циклооксигеназа-2, индуцибельная NO-синтаза, молекул клеточной адгезии (ICAM-1) [3]. Несмотря на накопленный к настоящему времени фактический материал о роли NF-кВ в жизнедеятельности клетки, существуют значительные разногласия в оценке активации данного транскрипционного фактора АФК. Современные данные литературы, характеризующие эффект сигаретного дыма на NF-кВ, также весьма противоречивы. Сообщают, что сигаретный дым активировал, ингибировал и не оказывал эффекта на активацию NF-кВ в различных типах клеток [4, 5].

Цель работы — оценка показателей оксидантно-антиоксидантного состояния и концентрации ядерного фактора-кВ в альвеолярных макрофагах в условиях воздействия сигаретного дыма.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с «Правилами работы с экспериментальными животными». АМ получали из бронхоальвеолярной лаважной жидкости крыс. Из популяций клеток АМ выделяли путем адгезии к пластику в концентрации $2,0 \times 10^6$ на чашку Петри и инкубировали 120 мин при температуре 37°C в увлажненной атмосфере с 5%-м содержанием CO₂. После чего АМ инкубировали в питательной среде Игла (DMEM), обогащенной сигаретным дымом (0,7 и 2,1 г/л смол) в течение 1 и 20 ч. Экстракт сигаретного дыма (ЭСД) был получен методом пропускания дыма через 100 мл DMEM с использованием автоматического вакуумного насоса. ЭСД стерилизовали с применением бактериального фильтра (Millipore, Sigma), диаметр пор — 0,22 мкм.

Для оценки состояния свободнорадикальных процессов в АМ измеряли концентрацию пероксида водорода; продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали по количеству образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразинов в реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином. Состояние ферментативной антиоксидантной системы АМ оценивалось по уровню активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГПО), каталазы. Внутриклеточный уровень небелковых SH-соединений в АМ определяли спектрофотометрически с использованием реактива Элмана. NF-кВ оценивали по транслокации субъединицы р65 из цитоплазмы в ядро. Субъединица р65 NF-кВ была выявлена с помощью блот-анализа с использованием первичных крысиных антител (Stress gene KAS-TF110, США) и вторичных антител, меченых пероксидазой хрена (Rochland, США). Учет реакции проводили денситометрически, анализ изображений проводили с использованием программы Image I 1.34s.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи U-теста Манна–Уитни для непараметрических выборок. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При оценке состояния свободнорадикальных процессов в АМ при контакте с ЭСД было установлено, что инкубация АМ с ЭСД (0,7 г/л смол) в течение 1 ч вызывала увеличение H₂O₂ в клетках на 54,4% и в 2,2 раза с ЭСД (2,1 г/л) по отношению к контролю; суммарное (в среде инкубации и в клетках) содержание H₂O₂ возросло на 50% в течение 20 ч инкубации АМ с ЭСД. Содержание карбонильных про-

изводных белков повышалось в 2 раза в АМ, контактировавших с ЭСД (0,7 г/л), и в 2,5 раза с ЭСД (2,1 г/л), длительность инкубации увеличивала этот показатель в 7 раз по сравнению с контролем независимо от концентрации ЭСД. Максимально высокий уровень ТБК-активных продуктов был отмечен при относительно продолжительной (20 ч) инкубации АМ с ЭСД в концентрации 2,1 г/л смол. Уровень ТБК-активных продуктов был выше контрольного и при кратковременной (в течение 1 ч) инкубации АМ с ЭСД (2,1 г/л). При использовании более низкой концентрации ЭСД уровень ТБК-активных продуктов не отличался от контрольного значения. При длительном контакте АМ с ЭСД регистрировалось увеличение количества ТБК-активных продуктов на 63,6% при концентрации ЭСД 0,7 г/л и в 2,5 раза соответственно большей концентрации ЭСД.

Нами установлено, что ЭСД вызывает угнетение антиоксидантной системы. ЭСД оказывал выраженное ингибирующее влияние на активность каталазы и ГПО. Уже через 1 ч активность каталазы была значительно снижена по сравнению с контролем. При длительной инкубации особенность заключалась в том, что снижение активности ГПО имело зависимость от концентрации ЭСД, а более выраженное снижение активности каталазы происходило под влиянием минимальной (0,7 г/л) концентрации ЭСД и в дальнейшем не имело развития. Активность СОД через 1 ч инкубации АМ с ЭСД (0,7 г/л) не отличалась от контроля. Повышение концентрации ЭСД вызывало достоверное снижение активности СОД.

Обнаружено, что инкубация с ЭСД в течение 1 ч приводит к снижению содержания небелковых SH-соединений в АМ на 16,3 и 28,8% соответственно концентрации ЭСД (0,7 и 2,1 г/л). Длительный контакт клеток (20 ч) с ЭСД вызывает снижение небелковых SH-соединений на 40,5% по сравнению с контролем независимо от концентрации ЭСД.

Анализ содержания р65 в цитозольной и ядерной фракциях АМ показал, что через 18 ч инкубации с ЭСД относительное количество р65 в ядре увеличилось на 69,7% по сравнению с контрольным уровнем (18,40:12,14 — 19,55 ед./мкг) и составило 31,23:20,60 — 33,17 ед./мкг ($p < 0,05$). При этом содержание общего белка под воздействием ЭСД снижалось в нуклеарной фракции до 600,4:540,5 — 680,5 мкг/мл (контроль — 1000,8:860,8 — 1030,9 мкг/мл). В цитозольной фракции снижение концентрации белка также было существенным, до 780,9:570,9 — 820,2 мкг/мл против контроля 900,8:870,7 — 930,2 мкг/мл, в то время как белок р65 в цитозольной фракции макрофагов, подвергнутых контакту с ЭСД, не выявлялся.

Обнаруженные возрастание концентрации H_2O_2 , ТБК-активных продуктов ПОЛ, а также снижение активности антиоксидантных ферментов и количества небелковых SH-соединений свидетельствуют об изменении окислительного метаболизма в АМ в результате контакта с ЭСД. На изменение окислительного метаболизма в АМ при контакте с ЭСД указывает и установленное увеличение карбонильных производных аминокислот. Известно, что белки являются эффективными ловушками АФК, их окислительная модификация может рассматриваться как один из ранних и надежных маркеров окислительного повреждения в тканях.

Токсическое действие АФК нивелируется в результате функционирования антиоксидантной системы (АОС), которая обеспечивает физиологический уровень оксидантов в тканях. Исключительно важным моментом эффективности ферментного звена АОС является сбалансированность активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы. Подавление активности одного из ферментов способствует избыточному накоплению активных форм кислорода и деструкции клеток.

Возможной причиной повышения концентрации H_2O_2 в АМ под влиянием ЭСД наряду с увеличением образования является снижение активности каталазы и ГПО. Каталаза катализирует реакцию восстановления H_2O_2 до воды в клетках. ГПО, используя восстановленную форму глутатиона в качестве субстрата, эффективно расщепляет не только H_2O_2 , но и органические гидроперекиси. Интересно, что активность ключевого фермента, СОД катализирующего реакцию дисмутации O_2 в H_2O_2 также снижалась при контакте АМ с ЭСД. Таким образом, подъем уровня пероксида водорода в этих клетках под влиянием ЭСД протекает на фоне угнетения работы ферментативного звена метаболизма H_2O_2 . Известно, что уровень активности внутриклеточных ферментативных антиоксидантов генетически детерминирован, при этом избыточное накопление в клетках H_2O_2 сопровождается снижением скорости транскрипции участков генома, ответственных за синтез антиоксидантных ферментов.

Снижение активности изучаемых ферментов может быть связано и с прямым действием АФК: окислительной модификацией аминокислотных остатков, изменением валентности и нарушением координационной геометрии металлов в области активного центра [6]. Установлено, что ключевую роль в катализе Se-содержащей ГПО играет селеноцистеин. В присутствии O_2 образуется радикал Se, затем перокси-радикал SeO_2 , который превращается в SeO_2H , что вызывает торможение каталитической активности ГПО. Значит, регистрируемое нами увеличение карбонильных производных в АМ при контакте с ЭСД является одним из проявлений окислительной модификации аминокислотных остатков белковых молекул и может быть прямо сопряжено со снижением активности этих ферментов.

Можно предположить, что уменьшение количества восстановленного глутатиона в АМ после контакта с ЭСД способствует наблюдаемому в наших экспериментах снижению активности ГПО и увеличению количества H_2O_2 и ТБК-активных продуктов ПОЛ. Дело в том, что восстанавливая H_2O_2 и гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот, этот фермент предупреждает накопление вторичных продуктов перекисацции. SH-соединения, поддерживая тиол-дисульфидное равновесие в клетке, обеспечивает модулирование конформационного состояния белковых молекул и регулирует активность многих ферментов.

Обнаруженный нами дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в альвеолярных макрофагах при контакте клеток с ЭСД способен быть причиной продемонстрированного в наших экспериментах увеличения

содержания субъединицы p65 в ядре, т. е. активации NF-κB. Как известно, NF-κB находится в цитоплазме в неактивном состоянии в комплексе с ингибиторным белком IκB. Активируется NF-κB многими стимулами, включая цитокины, оксиданты, вирусы и антигены, которые увеличивают воспалительный ответ в тканях. Сигнальное событие (АФК и гидроперекиси липидов либо эффекторные молекулы, участвующие в сигнальных путях) приводит к транслокации белковых субъединиц транскрипционного фактора в ядро, где он связывается со специфическими последовательностями в промоторной зоне контролируемых генов [7].

Результаты исследования позволяют предполагать доминирующую роль АФК в активации NF-κB в альвеолярных макрофагах, который играет важную роль в развитии воспалительного процесса в легочной ткани, вызванного воздействием сигаретного дыма.

Заключение:

1. Воздействие сигаретного дыма вызывает изменение интенсивности окислительного метаболизма в альвеолярных макрофагах, которое заключается в увеличении продукции АФК на фоне снижения активности ферментов антиоксидантной защиты. В результате увеличивается интенсивность окислительной модификации белковых молекул и процессов перекисного окисления липидов. Выявленные изменения метаболизма в АМ зависят от концентрации экстракта сигаретного дыма и длительности его воздействия на клетки легких.

2. При длительном (18 ч) воздействии экстракта сигаретного дыма на альвеолярные макрофаги в ядрах клеток увеличивается количество дискретной субъединицы p65 ядерного фактора — κB.

Литература

1. Rahman, I. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD / I. Rahman, I.M. Adcock // Eur. Respir. J. — 2006. — Vol. 28, № 1. — P. 219–242.
2. Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-κB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells / F.M. Moodie [et al] // FASEB J. — 2004. — Vol. 18, № 15. — P. 1897–1899.
3. Hoffmann, A. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling / A. Hoffmann, D. Baltimore // Immunol. Rev. — 2006. — Vol. 210. — P. 171–186.
4. Gloire, G. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later / G. Gloire, S. Legrand-Poels, J. Piette // Biochem. Pharmacol. — 2006. — Vol. 72, № 11. — P. 1493–1505.
5. Pryor, W.A. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyhydrate, and peroxyhydrate / W.A. Pryor, K. Stone // Ann. NY Acad. Sci. — 1993. — Vol. 686. — P. 12–27.
6. Uchida, K. Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂ / K. Uchida, S. Kawakishi // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269, № 4. — P. 2405–2410.
7. Favatier, F. Tobacco-smoke-inducible human haem oxygenase-1 gene expression: role of distinct transcription factors and reactive oxygen intermediates / F. Favatier, B. S. Polla // Biochem. J. — 2001. — Vol. 353, pt. 3. — P. 475–482.

NUCLEAR FACTOR-KB AND FREE RADICAL METABOLISM IN ALVEOLAR MACROPHAGES UNDER THE INFLUENCE OF CIGARETTE SMOKE

Devina E.A., Tahanovich A.D.

Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

The investigation has been carried out to study the role of alveolar macrophages (AMs) in the formation inflammatory reaction caused by exposure to cigarette smoke (CS) on the lungs. AMs are activated by CS to release inflammatory mediators. The aim was evaluate markers of free radical metabolism and a concentration of nuclear factor-κB (NF-κB) under the influence of CS in AMs. The concentration of H₂O₂, the level of thiobarbituric acid reactive substances and protein carbonyl products produced by AMs were revealed to increase significantly. These changes were followed by suppressed activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and a decreased the level of glutathione. The concentration of p65 subunit of NF-κB in the nuclear fraction of AMs increased under the influence of CS. The data obtained suggest a dominant role of reactive oxygen species in the activation of NF-κB and the development of inflammation in the lung tissue caused by exposure to cigarette smoke.

Keywords: alveolar macrophages, cigarette smoke, free radical metabolism, nuclear factor-κB.