

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
БЕЛАРУСИ»

УДК 612.223.014.464:577.121

ЛОБАНОВА Елизавета Михайловна

**СОСТОЯНИЕ МЕТАБОЛИЗМА В АЛЬВЕОЛЯРНЫХ
МАКРОФАГАХ В УСЛОВИЯХ СНИЖЕННОЙ
КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА И ПОВЫШЕННОЙ
ТЕМПЕРАТУРЫ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ**

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Минск 2006

Работа выполнена в УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Таганович А. Д. (УО «Белорусский государственный медицинский университет», заведующий кафедрой биологической химии)

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Никандров В. Н. (ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», заведующий лабораторией регуляторных белков и пептидов)

доктор биологических наук, профессор
Буко В. У. (ГУ «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», заведующий лабораторией экспериментальной гепатологии)

Оппонирующая организация: УО «Витебский государственный медицинский университет»

Защита состоится 10 ноября 2006 г. в 16⁰⁰ часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.36.01 при ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» (220072, г. Минск, ул. Академическая, 28, тел. 284-18-47, факс 284-16-30,
e-mail: biblio@fizio.bas-net.by).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Автореферат разослан « ____ » _____ 2006 года.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций
кандидат биологических наук
Рубахова

В. М.

© ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», 2006

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами

Диссертация является фрагментом научно-исследовательской работы кафедры биохимии Белорусского государственного медицинского университета (БГМУ) по теме «Экспериментально обосновать закономерности нарушения метаболизма в клетках легких при синдроме острой дыхательной недостаточности и разработать новые критерии для диагностики развития этого состояния при искусственной вентиляции легких», номер гос. регистрации 2005424, сроки выполнения 2004–2007 гг.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: определить особенности метаболизма, функциональной активности, жизнеспособности альвеолярных макрофагов (АМ) в условиях низкого содержания кислорода (O_2) и высокой температуры окружающей среды и обосновать подходы к коррекции выявленных изменений.

Задачи исследования:

1. Установить особенности гибели АМ при недостатке O_2 в окружающем пространстве и высокой температуре.
2. Оценить влияние дефицита O_2 в окружающей среде и высокой температуры на фагоцитарную активность АМ.
3. Изучить влияние недостатка O_2 и высокой температуры на показатели окисления глюкозы, метаболизма активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) в АМ.
4. Обосновать возможность коррекции метаболизма АМ, их жизнеспособности и функционального состояния при низкой концентрации O_2 и высокой температуре окружающей среды.

Объектом настоящего исследования являлись АМ крыс, подвергнутые воздействию недостатка O_2 и/или высокой температуры, а также среда инкубации данных клеток.

Предметом исследования было изучение закономерностей изменения показателей обмена углеводов, окислительно-антиоксидантного баланса, гомеостаза ионов Ca^{2+} , процессов клеточной гибели, а также фагоцитарной активности АМ крыс в ответ на недостаток O_2 в окружающей среде и высокую температуру.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. При инкубации в условиях недостатка кислорода и высокой температуры окружающей среды в альвеолярных макрофагах происходит перестройка энергодающих и других окислительных процессов, сопровождающаяся ростом концентрации активных форм кислорода и азота. Росту содержания последних способствует угнетение активности

антиоксидантных ферментов, увеличение активности индуцибельной NO-синтазы, повышение внутриклеточного уровня ионов Ca^{2+} .

2. Метаболические изменения сопровождаются снижением фагоцитарной активности клеток уже после 2 часов инкубации в атмосфере низкой концентрации кислорода и увеличением их гибели через 20 часов. Гибель клеток в этот период связана с активацией процессов апоптоза. Присоединение к недостатку кислорода температурного фактора усугубляет снижение поглотительной способности альвеолярных макрофагов, но увеличивает их жизнеспособность.

3. Под влиянием антиоксиданта N-ацетилцистеина происходит коррекция изменений метаболизма и функционального состояния альвеолярных макрофагов. Использование с аналогичной целью антигипоксанта сукцината нецелесообразно, поскольку указанное соединение может оказывать прооксидантный эффект и способствовать гибели клеток.

Личный вклад соискателя

Соискателем лично получены приведенные в работе результаты, проведена статистическая обработка данных, их анализ, подготовка к публикации печатных работ. В исследовании процессов клеточной гибели АМ принимали участие сотрудники лаборатории биохимических методов исследования Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) БГМУ. Научный руководитель, помимо постановки целей и задач исследования, оказывал консультативную помощь в постановке экспериментов, обсуждении и трактовке полученных результатов.

Апробация результатов диссертации

Включенные в диссертацию результаты исследований доложены и обсуждены на конференции «Актуальные вопросы современной пульмонологии и фтизиатрии» (г. Минск, 2004 г.), V Парнасовской конференции (г. Киев, Украина, 2005 г.), международной конференции «Молодежь в науке – 2005» (г. Минск, 2005 г.), научно-практических конференциях «Современные проблемы медицинской и клинической биохимии» (г. Черновцы, Украина, 2005 г.) и «Гипоксия в биологии и заболеваниях легких» (г. Таормина, Италия, 2006 г.), конференциях молодых ученых ВГМУ (г. Витебск, 2005 г.), Буковинского ГМУ (г. Черновцы, Украина, 2005 и 2006 гг.) и Российского ГМУ (г. Москва, РФ, 2006 г.), ежегодных научных сессиях БГМУ (г. Минск, 2005 и 2006 гг.), конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, РФ, 2006 г.), 31-ом ежегодном конгрессе Европейского биохимического общества (Стамбул, Турция, 2006 г.) и Европейском конгрессе по болезням органов дыхания (Мюнхен, ФРГ, 2006 г.).

Опубликованность результатов

По материалам диссертации опубликовано 23 работы: 14 статей (9 в журналах, 5 в рецензируемых сборниках, материалах конференций и конгрессов),

9 тезисов в материалах конференций и конгрессов (из них 8 — в зарубежных).

9 работ опубликовано без соавторов. Общий объем опубликованных материалов — 5 авторских листов (из них лично соискателем — 1,5).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов собственных исследований (3 главы), заключения, библиографического списка, включающего 309 источников литературы (39 на русском, 270 — на английском языке) и список публикаций соискателя — 23 работы (19 на русском, 4 — на английском языке), приложения. Работа содержит 14 таблиц и 14 рисунков, изложена на 116 страницах печатного текста (основной текст — 87 страниц, таблицы и рисунки — 3, списки использованных источников и публикаций соискателя — 26 страниц).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В экспериментах использованы белые беспородные крысы-самцы (*Rattus norvegicus*) массой 180–200 г.

Получение материалов для исследования: АМ получали методом стандартного бронхоальвеолярного лаважа. К полученной первичной культуре добавляли 2 мл свежей среды Игла, модифицированной Дульбекко, с 10 % эмбриональной сыворотки и культивировали в течение 2 ч (20 ч в опытах по определению формы гибели клеток) в условиях нормальной (21 %) и сниженной концентрации O₂ (1. 10 % O₂, 5 % CO₂, 85 % N₂; 2. 5 % O₂, 5 % CO₂, 90 % N₂) в интервале температур 37–42 °С. Далее среду инкубации отсасывали, а к прилипшим АМ добавляли раствор NaCl и соскребали клетки скрепером (Costar, США). Клеточную суспензию разрушали методом гомогенизации вручную стеклянным шариковым гомогенизатором (Braun, ФРГ). Экспериментальная работа проводилась в одно и то же время суток.

Методы оценки метаболической активности альвеолярных макрофагов: спектрофотометрически определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) по Н. Д. Ещенко (1982), сукцинатдегидрогеназы (СДГ) — по Н. Д. Ещенко, Г. Г. Вольскому (1982) и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Гл-6Ф-ДГ) — по Ф. Е. Путиловой, С. Д. Зоиде (1982), а также концентрацию H₂O₂ (Н. Gallati, I. Pracht, 1985), NO₂⁻ (L. S. Green, 1982) и тиобарбитуровая кислота (ТБК)-активных продуктов (М. С. Гончаренко, А. М. Латинова, 1985). Для измерения

содержания общего белка использовали метод O. Lowry в модификации G. L. Peterson (1977). Оценивали активность основных ферментов антиоксидантной защиты: каталазы (Кат) — методом М. А. Королюка и соавт. (1988) и глутатионпероксидазы (ГП) — методом В. М. Моина (1986). Измерение активности супероксиддисмутазы (СОД) проводили унифицированным методом В. А. Костюка и соавт. (1990) с использованием наборов фирмы «Анализ-Х». Определение внутриклеточного уровня восстановленного глутатиона (Г-SH) выполняли спектрофотометрически — по J. Seldak (1968), а свободных Ca^{2+} -ионов — флуориметрически при помощи зонда Fura 2-AM по G. Grynkiewicz (1985).

Методы оценки фагоцитарной активности и форм клеточной гибели альвеолярных макрофагов. Фагоцитарную активность АМ оценивали по интенсивности поглощения клетками (в количестве ≥ 100) бактериальной суспензии *Staphylococcus aureus*. Определяли фагоцитарный показатель (ФП) — процент фагоцитирующих клеток из числа сосчитанных АМ; и фагоцитарное число (ФЧ) — среднее число микроорганизмов, поглощенных одним активным АМ. Жизнеспособность АМ определяли по окраске клеток трипановым синим, а исследование форм клеточной гибели проводили путем обработки клеток аннексин-V-флуоресцеиновым изотиоцианатом (ФИТЦ) (ранний апоптоз) и пропидий йодидом (завершенный апоптоз либо некроз) с помощью стандартного набора реагентов (Caltag Laboratories, США) и последующей проточной цитометрией клеток.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel XP» и «Statistica 6.0», а также программы «Biostatistics for Windows 4.03». Для статистической обработки результатов использовали непараметрические методы анализа: ранговый анализ вариаций по Краскелу–Уоллису с последующим попарным сравнением групп при помощи *U*-теста Манна–Уитни (с поправкой Бонферрони для значения *p*) и корреляционный анализ для оценки взаимосвязи изменений определенных показателей. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медиан и интерквартильных размахов (медиана: 25-й перцентиль — 75-й перцентиль), что включает 50 % значений признака в выборке.

Жизнеспособность и фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов в условиях недостатка кислорода и высокой температуры

Инкубация АМ при 37 °С и 10 % O_2 в течение 20 ч увеличивала процент гибнущих клеток — с 3,43 % в контроле (из них 0,62 % — апоптоз и 2,81 % — завершенный апоптоз или некроз) до 16,31 % (из них 12,51 % — апоптоз и 3,80 % — завершенный апоптоз или некроз). Достоверное повышение количества АМ, связывающих аннексин-V, и отсутствие значимых изменений числа клеток, окрашенных пропидий йодидом, свидетельствовали

об активации в культуре АМ процессов апоптоза (рисунок 1). При дальнейшем уменьшении содержания O_2 в инкубационном пространстве до 5 % доля погибших клеток снизилась с 16,31 % до 7,24 %, хотя и оставалась выше контрольных (при 37 °С и 21 % O_2) показателей. Данное снижение происходило за счет значительного уменьшения количества аннексин-V-позитивных клеток (до 4,09: 2,09–5,02 %).

Культивирование при 42°С также приводило к достоверному (в 1,9 раза) увеличению доли АМ, подвергшихся апоптозу. Сочетание 42 °С и 10 % O_2 вызывало гораздо более интенсивную, чем при воздействии только перегревания (в 3 раза выше контрольных значений), но значительно менее выраженную, чем в условиях только дефицита O_2 , гибель АМ апоптотическим путем. Снижение концентрации O_2 до 5 % при 42 °С, как и при 37 °С, приводило к возвращению количества аннексин-V-позитивных клеток, практически, к контрольным значениям.

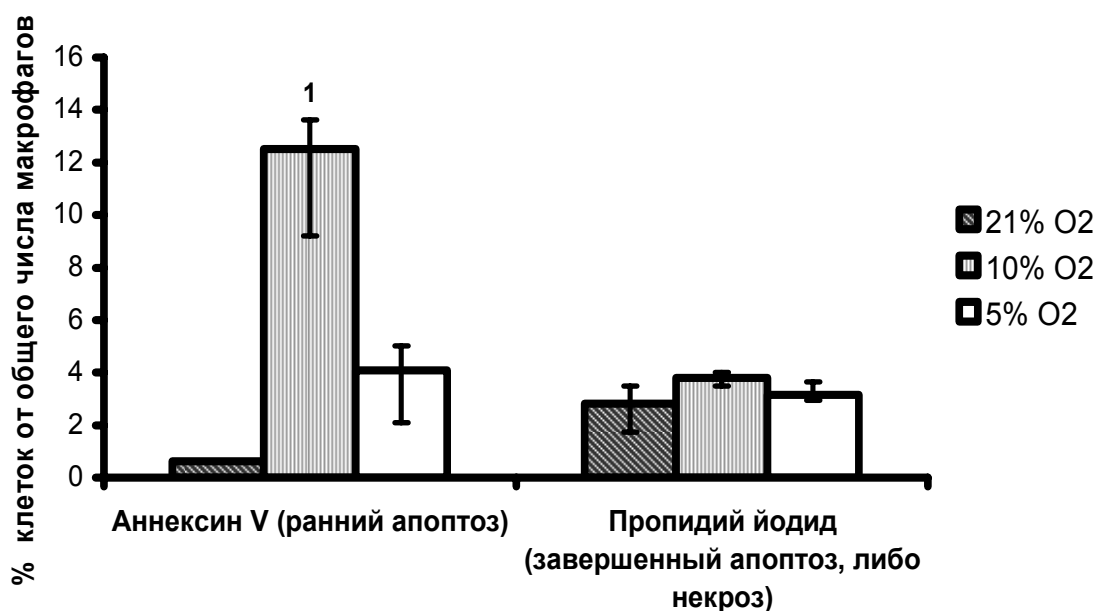


Рисунок 1 – Влияние недостатка кислорода на активность процессов апоптоза и некроза в альвеолярных макрофагах (37 °С)

Примечание. Каждое значение — результат трёх независимых экспериментов; ¹ — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (% аннексин-V-окрашенных АМ, инкубированных при 37 °С и 21 % O_2).

Одновременно, снижение концентрации O_2 в окружающем воздушном пространстве до 10 %, а затем — до 5 % при 37 °С уже спустя 2 ч инкубации приводило к уменьшению ФП макрофагов, приблизительно, на 23 % и 32 %, соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние дефицита кислорода и температуры инкубации на фагоцитарный показатель альвеолярных макрофагов (n=5)

Концентрация	Температура, °С
--------------	-----------------

O ₂ , %	37	38	39	40	41	42
21	35: 34-35	37: 33-37	35: 27-35	37: 37-40 ¹	38: 35-39	38: 34-42
10	27: 21-30 ¹	11: 11-14 ^{1,2,3}	18: 18-19 ^{1,2,3}	23: 20-27 ^{1,2}	9: 8-15 ^{1,2,3}	15: 12-15 ^{1,2,3}
5	24: 20-27 ¹	13: 7-16 ^{1,2,3}	16: 11-22 ^{1,2}	16: 9-19 ^{1,2,3}	12: 11-18 ^{1,2,3}	13: 11-16 ^{1,2,3}

Примечание: ¹ — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (21 % O₂, 37 °C); ² — $p < 0,05$ по сравнению с 21 % O₂ при соответствующей температуре; ³ — $p < 0,05$ по сравнению с 37 °C при соответствующей концентрации O₂.

Аналогичная инкубация АМ при повышенной температуре и нормальном (21 %) доступе O₂ не вызывала значимых изменений в величине ФП, в то время как повышение температуры на фоне недостатка O₂ (10 % и 5 %) значительно снижало величину ФП. При 42 °C ФП снижался на 44,4 % (10 % O₂) и 45,8 % (5 % O₂) по отношению к таковому в клетках, инкубированных при 37 °C и соответствующей концентрации O₂.

Практически при всех экспериментальных условиях наблюдалось снижение ФЧ макрофагов. При 42 °C и резком недостатке O₂ (5 %) оно было в 2,5 раза ниже контрольных значений.

Исследование способности модуляторов фагоцитарной активности АМ, таких как тетрафорболмиристилацетат (ТФА) и дибутирил циклический аденозинмонофосфат (дибутирил цАМФ), модифицировать супрессирующий эффект недостатка O₂ и высокой температуры, позволило выяснить, что при 21 % O₂ и 37 °C добавление в среду 10⁻⁴ М дибутирил цАМФ (Sigma, США) проявлялось в достоверном снижении ФП макрофагов на 54,3 %, в то время как введение 10⁻⁷ М ТФА (Sigma, США) не вызывало значимых изменений. Внесение ТФА в среду инкубации на фоне повышения температуры приводило к статистически достоверному падению величины ФП АМ в атмосфере 21 % O₂ (22: 17–23), однако в случае 5 % содержания O₂ ФП клеток был одинаково низким как при 37 °C (13: 10–43), так и при 42 °C (12: 11–21). Введение дибутирил цАМФ в инкубационную среду АМ, подвергавшихся воздействию 42 °C, не вызывало изменения величины ФП ни при 21 %, ни при 5 % O₂. На основании полученных данных можно предположить, что в основе снижения фагоцитарной активности АМ при недостатке O₂ лежит наработка цАМФ. Повышение температуры, по-видимому, нарушает этот механизм.

Добавление к АМ любого из указанных выше клеточных модуляторов с последующей инкубацией клеток при 21 % O₂ и 37 °C приводило к статистически достоверному снижению ФЧ. Аналогичные добавки на фоне пониженного содержания O₂, повышенной температуры и их сочетания не вызывали существенных колебаний ФЧ, которое оставалось одинаково сниженным относительно контрольных значений. Это наводит на мысль, что несмотря на способность механизмов, опосредованных протеинкиназами А и

C, уменьшать ФЧ, их участие в снижении этого показателя под влиянием высокой температуры и низкой концентрации O_2 , отсутствует.

Изменения показателей метаболизма в альвеолярных макрофагах в ответ на недостаток кислорода и высокую температуру

Исследовано влияние низкой концентрации O_2 и высокой температуры окружающей среды на ряд показателей метаболизма глюкозы — ведущего источника энергии в АМ.

Инкубация АМ при 10 % O_2 и 37 °С приводила к снижению активности СДГ (медиана ее значений уменьшалась с 7,21 до 6,37 нмоль/мин/мг) и одновременно повышению активности Гл-6Ф-ДГ (с 15,7 до 18,6 нмоль/мин/мг). Еще более выраженное изменение активности ферментов имело место при 5 % O_2 . Медиана активности СДГ в этих условиях была ниже контрольной на 28,6 %, в то время как ЛДГ и Гл-6Ф-ДГ увеличивалась на 57,7 % и 74,5 %, соответственно. Изменения были статистически достоверны по отношению к аналогичным показателям при 21 % O_2 и 10 % O_2 в окружающей среде. Повышение температуры инкубации клеток с 37 °С до 42 °С (21 % O_2) вызывало падение активности СДГ (на 23,3 % ниже контрольного уровня) и слабо выраженную тенденцию к росту для ЛДГ; активность Гл-6Ф-ДГ, вначале нечувствительная к подъему температуры инкубации, впоследствии существенно увеличивалась и при 42 °С была на 18,5 % выше исходной.

Активирующее действие перегревания на Гл-6Ф-ДГ резко возрастало при сочетании высокой температуры инкубации и выраженного снижения концентрации O_2 в инкубационной газовой смеси (до 5 %). В этих условиях медиана значений активности для этого фермента была на 60,9 % выше таковой при 5 % O_2 и 37 °С. Прогрессирующе снижалась активность СДГ: если при 21 % O_2 и 42 °С она составляла 76,7 %, при 5 % O_2 и 37 °С — 71,4 %, то при 5 % O_2 и 42 °С — 58,9 % от контрольных значений. На активность ЛДГ при 5 % O_2 повышение температуры влияния не оказывало.

Рост активности ЛДГ при недостаточном функционировании СДГ, по-видимому, имел компенсаторный характер для возмещения энергодефицита, возникающего вследствие угнетения работы цикла трикарбоновых кислот. Однако сочетанное действие недостатка O_2 и перегревания нарушало этот механизм. Как видно из таблицы 2, при 37 °С снижение доступа O_2 до 5 % приводило к угнетению активности СДГ, но сопровождалось ростом активности ЛДГ и Гл-6Ф-ДГ. На фоне же увеличения температуры аналогичное ограничение доступа O_2 проявлялось в ещё большем снижении активности СДГ, в то время как рост активности ЛДГ оставался на том же уровне.

Таблица 2 – Зависимость изменений активности ЛДГ, СДГ и Гл-6Ф-ДГ, индуцированных недостатком кислорода, от температуры (n=6)

Исследуемые ферменты	Условия инкубации		
	5% O ₂ , 37°C	5% O ₂ , 39°C	5% O ₂ , 42°C
ЛДГ	157,72 ¹	154,82 ¹	154,82 ¹
СДГ	71,43 ¹	65,60 ^{1,2}	58,95 ^{1,2}
Гл-6Ф-ДГ	174,52 ¹	190,45 ^{1,2}	280,89 ^{1,2}

Примечание. Все данные представлены в виде процентного отношения к контролю (медиана); за 100 % принята активность ферментов при 21 % O₂ и 37 °С (контроль); ¹ — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ² — $p < 0,05$ по сравнению с условиями 5 % O₂ и 37 °С.

О взаимосвязи развивающегося в АМ энергодефицита и снижения их поглотительной способности свидетельствовали результаты статистического анализа, согласно которым на фоне снижения доступа O₂, независимо от температуры, имеется сильная прямая корреляционная связь между снижением активности СДГ в АМ и величины ФП этих клеток (*Spearman R* = 0,874 ($p = 0,002$) — при 37 °С и *Spearman R* = 0,835 ($p = 0,005$) — при 42 °С).

Снижение концентрации O₂ в окружающей среде до 5 % (37 °С) сопровождалось тенденцией к увеличению концентрации H₂O₂ по отношению к контролю. При перегревании продукция макрофагами H₂O₂, будучи нечувствительной к подъему температуры до 39 °С, при дальнейшем увеличении температуры нарастала, и при 42 °С достигала 159,8 %. Рост температуры инкубации усиливал эффект, оказываемый снижением доступа O₂ на накопление в клетках H₂O₂ (таблица 3). Аналогичным было изменение концентрации ТБК-активных продуктов. Прогрессирующее ее повышение с ростом температуры обнаруживалось при всех исследуемых концентрациях O₂. Подобно H₂O₂, максимально высокий уровень ТБК-активных продуктов был отмечен при температуре инкубации 41–42 °С и содержании O₂ 5–10 %. Значения медианы концентрации ТБК-активных продуктов в этих условиях в 1,16 раза превышало соответствующее значение при 42 °С, 21 % O₂, и в 1,86 раза — при 37 °С, 5 % O₂. Полученные данные демонстрируют потенцирующее негативное влияние недостатка O₂ и высокой температуры на состояние окислительных процессов в АМ.

Таблица 3 – Влияние недостатка кислорода и температуры инкубации на образование клетками H₂O₂ и ТБК-активных продуктов

Исследуемые показатели	Условия инкубации			
	Температура, °С	21% O ₂	10% O ₂	5% O ₂
H ₂ O ₂ , нмоль / 10 ⁶ клеток, n=4	37	3,61: 3,40–3,73	3,78: 3,68–3,85	3,99: 3,75–4,11
	38	3,26: 3,17–3,42	4,13: 4,06–4,22 ^{1,2,3}	4,01: 3,78–4,43 ²
	39	3,54: 3,33–3,64	4,57: 4,50–4,74 ^{1,2,3}	5,21: 4,93–5,98 ^{1,2,3}
	40	4,27: 4,18–4,46 ¹	5,40: 5,37–5,47 ^{1,2,3}	5,61: 4,47–5,68 ^{1,2,3}

	41	5,35: 5,04–5,54 ¹	6,36: 6,03–6,45 ^{1,2,3}	5,84: 5,54–6,01 ^{1,3}
	42	5,77: 5,63–5,98 ¹	6,24: 5,82–6,48 ^{1,3}	6,01: 5,77–6,20 ^{1,3}
ТБК-активные продукты, нмоль / 10 ⁶ клеток, n=6	37	2,01: 1,05–2,47	1,90: 1,35–2,245	2,01: 1,93–2,09
	38	2,21: 1,41–2,69	2,37: 1,79–3,59	3,00: 2,40–3,59
	39	2,98: 2,92–4,13 ¹	2,88: 1,79–4,35	3,41: 2,18–5,38 ^{1,3}
	40	3,43: 2,92–3,43 ¹	3,07: 2,09–4,87	3,62: 3,14–3,95 ^{1,3}
	41	3,16: 2,76–3,66 ¹	3,03: 2,31–3,75 ³	4,11: 3,66–4,26 ^{1,3}
	42	3,22: 2,31–4,80	3,33: 2,85–4,20 ^{1,3}	3,74: 3,59–4,33 ^{1,3}

Примечание: см. таблицу 1.

Исследование показателей антиоксидантной системы АМ в условиях недостатка O₂ и/или перегревания позволило обнаружить снижение активности ГП по мере уменьшения концентрации O₂ в окружающем воздушном пространстве, величина которого была, приблизительно, одинаковой как при 37 °С, так и при более высокой температуре, вплоть до 42 °С (рисунок 2Б). Это не означало, что температура не оказывала собственного влияния на наблюдаемое явление. По мере ее повышения активность ГП также неуклонно снижалась. В результате самый низкий уровень активности ГП при 5 % O₂ и 37 °С, сопоставимый с величиной этого показателя в клетках, инкубируемых при 10 % O₂ и 42 °С, с повышением температуры инкубации становился ещё более низким. При 42 °С и 5 % O₂ он составил лишь 44,0 % от такового при 21 % O₂ и 37 °С (8,46: 8,11–8,81 и 19,21: 19,04–20,45 нмоль/мин/10⁶ клеток, соответственно). Вызывая снижение активности ГП, дефицит O₂ при 37 °С не приводил, однако, к заметным изменениям активности Кат (35,47: 33,78–38,29 Е/10⁶ клеток при 21 % O₂ и 36,04: 33,22–37,16 Е/10⁶ клеток при 5 % O₂). При повышении температуры вплоть до 40 °С (21 % O₂) существенные сдвиги также отсутствовали (рисунок 2А). Дальнейший рост температуры инкубации, напротив, сопровождался выраженным угнетением активности Кат, которая при 42 °С (21 % O₂) была ниже контрольных значений на 36,5 %. Сочетанное влияние недостатка O₂ и перегревания потенцировало эффект на активность Кат в клетках. Так, активность Кат АМ, инкубировавшихся при 42 °С и 5 % O₂ составляла лишь 20,83: 16,89–21,96 Е/10⁶ клеток, что ниже контрольных значений на 41,3 %.

А

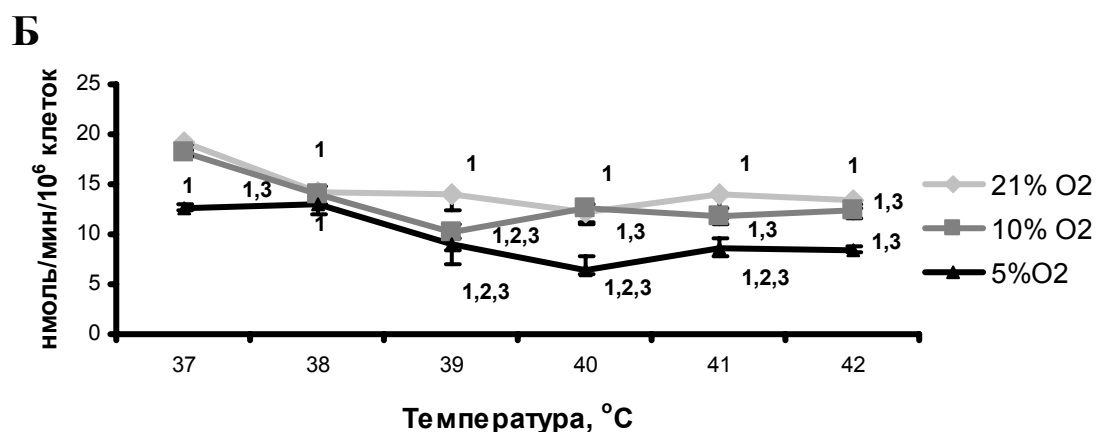
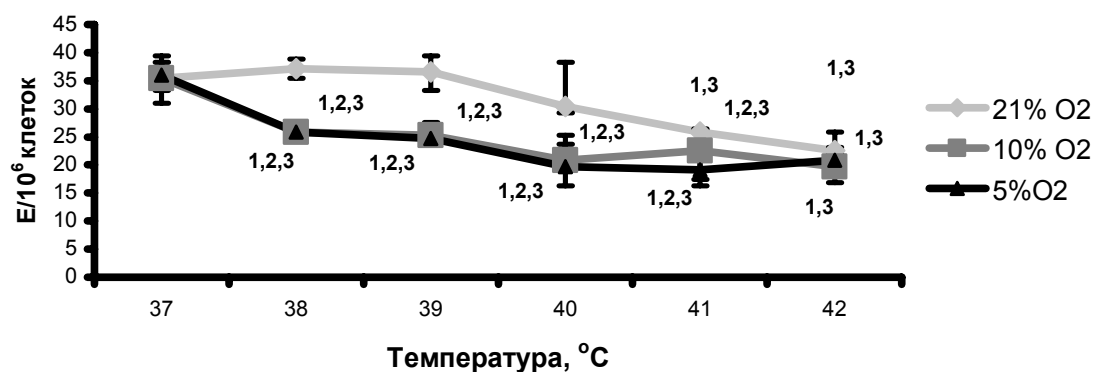


Рисунок 2 – Влияние дефицита кислорода и температуры на активность каталазы (А) и глутатионпероксидазы (Б) в альвеолярных макрофагах (n=6)

Примечание: см. таблицу 1.

Нам не удалось зафиксировать какие-либо изменения активности СОД в АМ, которая сохранялась на контрольном уровне как при снижении концентрации O₂ в окружающей воздушной среде, так и по мере увеличения температуры инкубации, вплоть до 42 °С.

Оценивая уровень в клетках продуктов, содержащих SH-группы (подавляющей частью которых является Г-SH) в некоторых случаях было обнаружено их существенное снижение по мере уменьшения концентрации O₂ в окружающем АМ пространстве с 21 до 5 % (таблица 4). Последующие эксперименты показали, что причиной уменьшения содержания Г-SH может быть его окисление с образованием Г-S-S-Г формы.

Таблица 4 – Влияние недостатка кислорода и/или высокой температуры инкубации на концентрацию в клетке продуктов, содержащих SH-группы

Исследуемые показатели	Условия инкубации			
	Температура, °C	21% O ₂	10% O ₂	5% O ₂
Продукты, содержащие SH-группы, нмоль / 10 ⁶	37	4,79: 3,84–5,33	4,52: 3,16–5,60	4,18: 3,84–4,38
	38	5,13: 4,52–5,33	3,57: 2,22–5,46	3,57: 3,30–3,84 ²

клеток, $n=6$	40	4,38: 2,89–5,46	5,73: 5,19–5,87 ¹	2,49: 2,35–2,62 ^{1,2,3}
---------------	----	--------------------	---------------------------------	-------------------------------------

Примечание: см. таблицу 1.

Для более полной оценки состояния окислительных процессов в АМ исследовалось влияние недостатка O_2 и/или перегрева на продукцию клетками АФА, в частности NO , прямым и стабильным метаболитом которого являются нитрит-ионы (NO_2^-). При концентрации O_2 в окружающем воздухе 5 % (37 °С) уровень NO_2^- увеличивался более чем в 2 раза по сравнению с контролем. В то же время, при 10 % O_2 имелась лишь тенденция к повышению. Увеличение температуры инкубации АМ с 37 до 42 °С также не оказывало влияния на концентрацию NO_2^- .

Установлено, что увеличение уровня NO_2^- в АМ при снижении концентрации O_2 во всем исследуемом диапазоне температур обусловлено изменением активности индуцибельной NO -синтазы (iNOS). Инкубация клеток при 37 °С, 21 % O_2 и при 42 °С, 5 % O_2 в присутствии 250 мкМ селективного ингибитора iNOS — *S,S'*-(1,3-фениленбис[1,2-этандинил])-бисизотиомочевина (1,3-РВІТ) (Sigma, США) приводила к выраженному снижению концентрации NO_2^- в среде инкубации и в клеточном гомогенате. Причем, при 42 °С и 5 % O_2 снижение было более значительным, практически до контрольного (37 °С, 21 % O_2 + 1,3 РВІТ) уровня.

Определение регуляторного механизма, ответственного за увеличение активности iNOS, служило мотивацией для проведения экспериментов, в ходе которых АМ инкубировались в течение 2 ч при 5 % O_2 , 42 °С в присутствии ингибиторов белкового синтеза: актиномицина D (Reanal, Венгрия), циклогексимида (Serva, ФРГ) и пурамицина (Reanal, Венгрия). Это не приводило к изменению концентрации NO_2^- ни в АМ, ни в среде их инкубации. Данные результаты позволили отвергнуть предположение о том, что наблюдаемый рост NO_2^- в АМ и окружающем их пространстве в условиях значительного дефицита O_2 обусловлен увеличением синтеза iNOS.

Другой вероятной причиной стимулированной работы iNOS может быть изменение активности уже синтезированного фермента. Внесение в среду дибутирил цАМФ (при 5 % O_2 и 42 °С) приводило к увеличению концентрации NO_2^- в среде инкубации АМ более чем на 70 %. При этом, внутриклеточный уровень NO_2^- обнаруживал лишь тенденцию к увеличению (с 17,65: 17,36–18,92 до 19,49: 18,78–20,19 нмоль/ 10^6 клеток). Добавление в этих же условиях ТФА, напротив, снижало концентрацию NO_2^- как непосредственно в АМ, так и в среде их инкубации. То есть дибутирил цАМФ, свободно проходящий в клетку и реализующий свое действие через протеинкиназу А, не только не снизил выросшую в результате повышенной температуры инкубации и дефицита O_2 наработку NO_2^- , но даже повысил ее. Это особенно хорошо видно из представленных результатов, если оценивать общий пул NO_2^- , образовавшихся в результате инкубации АМ в указанных условиях (рисунок 3). Таким образом, есть основания полагать, что

реализуемый посредством цАМФ путь регуляции может принимать участие в модуляции активности iNOS при недостатке O_2 и высокой температуре.

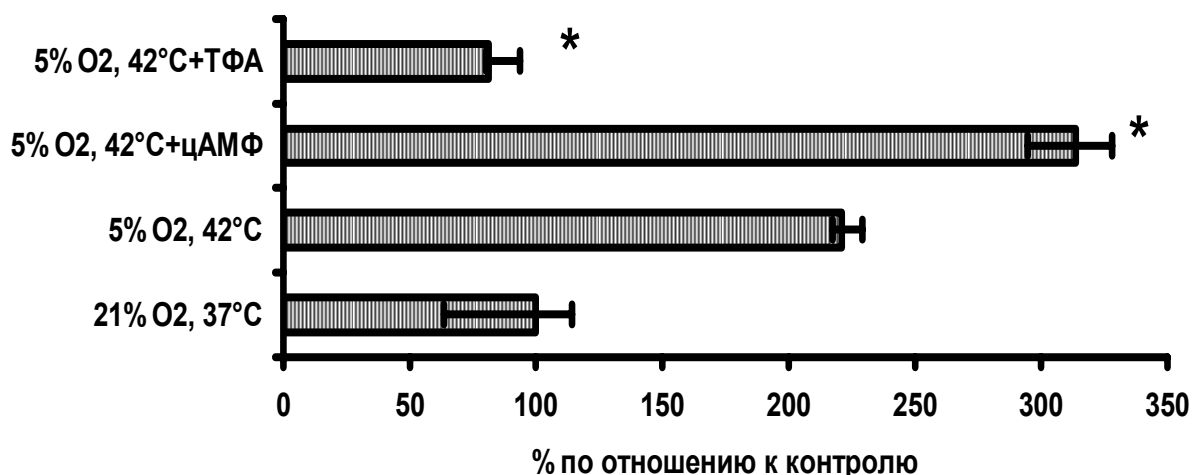


Рисунок 3 – Влияние модуляторов клеточного метаболизма на суммарный уровень NO_2^- в АМ и среде их инкубации

Примечание. Данные представлены как соотношение суммы медиан внутри- и внеклеточной концентрации NO_2^- при соответствующих условиях инкубации к аналогичной сумме при 21 % O_2 и 37°C (контроль), принятой за 100 %; длительность инкубации — 2 ч; * — $p < 0,05$ по сравнению со значениями при 5 % O_2 и 42 °С, без добавок.

С другой стороны, полученные данные позволяют предположить, что ТФА, осуществляя свое действие в клетке через образование диацилглицеролов, противостоял накоплению NO_2^- в АМ при 5 % O_2 и 42 °С. На этом основании вещества, регулирующие внутриклеточную активность протеинкиназы С, перспективны для изучения в качестве препаратов, действие которых направлено на предотвращение образования избытка NO макрофагами в условиях дефицита O_2 и перегревания.

Еще одним важным внутриклеточным посредником, принимающим участие в регуляции наработки АФК и АФА клетками (в частности — посредством активации NO-синтаз) является Ca^{2+} . Как показали результаты проведенных экспериментов, снижение концентрации O_2 в инкубационном пространстве с 21 до 5 % при температуре 37 °С привело к росту уровня Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в АМ, приблизительно, на 18 %. Хотя в данных условиях нам не удалось зафиксировать статистически значимых отличий, последующие эксперименты, проведенные при более высокой температуре инкубации, показали, что выявленная тенденция была не случайна. Если при повышении температуры с 37 до 42 °С (21 % O_2) $[Ca^{2+}]_i$ увеличивалась с 75,29: 38,52–99,27 до 106,05: 94,81–121,80 нмоль/л, то при сочетании недостатка O_2 и перегревания обнаруженные эффекты усиливались. Повышение температуры с 37 до 42 °С на фоне 10 % O_2 вызывало более значимый рост $[Ca^{2+}]_i$, чем соответствующее повышение при нормальном содержании O_2 . Дальнейшее снижение концентрации O_2 еще более усиливало выраженность

обнаруженных изменений. При 5 % O₂ и 42 °C [Ca²⁺]_i была более, чем в четыре раза выше контрольной (при 37 °C и 21 % O₂). Тем не менее, в нашем исследовании между [Ca²⁺]_i в АМ и продукцией NO₂⁻ клетками была обнаружена лишь слабая корреляционная взаимосвязь (*Spearman R* = 0,272, *p* = 0,0044).

Возрастающее количество NO в клетках при недостатке O₂ и высокой температуре, посредством образования пероксинитрита, способно окислять сульфгидрильные группы до дисульфидов и, тем самым, обуславливать обнаруженное и описанное выше снижение уровня Г-SH в АМ. Подтвердить это предположение помог эксперимент, в ходе которого перед инкубацией клеток (при 5 % O₂ и 42 °C) в среду инкубации был добавлен 1,3-РВІТ. В этом случае, в АМ, параллельно снижению уровня NO₂⁻ (на 27,4 % в гомогенате и на 24,2 % в среде их инкубации), нарастала внутриклеточная концентрация Г-SH (с 5,53: 4,79–6,27 до 7,49: 7,22–9,11 нмоль/10⁶ клеток).

Как уже упоминалось, число апоптотически погибших АМ, увеличивающееся при снижении доли O₂ до 10 %, при дальнейшем ограничении доступа O₂ (5 %) резко уменьшалось. При 42 °C и 5 % O₂ оно оставалось лишь на 11 % выше контрольных значений. В то же время, количество NO₂⁻, а следовательно NO, продуцируемого АМ, не изменялось при снижении доли O₂ в окружающей атмосфере до 10 %, но резко возрастало при уровне O₂, равном 5 %. Эти данные служили основанием для гипотезы, что при 5 % O₂ повышенное образование NO макрофагами ответственно за угнетение процессов апоптоза. Однако добавление в среду инкубации 1,3-РВІТ (5 % O₂, 42 °C) не только не увеличивало количество апоптотических клеток в исследуемой культуре, но даже снижало их более чем на 70 %. Таким образом, полученные результаты, напротив, свидетельствовали о проапоптотическом действии NO в исследуемых условиях.

Подходы к коррекции функциональных и метаболических изменений в АМ в условиях недостатка кислорода и высокой температуры

Результаты проведенных экспериментов привели к заключению о том, что важнейшей причиной угнетения фагоцитарной активности и жизнеспособности АМ в исследуемых условиях сниженной концентрации O₂ и повышенной температуры инкубации является нарушение внутриклеточного баланса оксидантов-антиоксидантов. Исходя из этого, для коррекции метаболизма клеток в указанных условиях мы попытались использовать вещества, обладающие антиоксидантным и антигипоксантным действием. В частности, изучалось присутствие в среде инкубации N-ацетилцистеина (НАС) и сукцината. Данные соединения (10⁻⁵ моль/л)

вводили в питательную среду клеток непосредственно перед их инкубацией в течение 2 или 20 ч в условиях 5 % (10 %) O_2 и 42 °С.

Обнаружено, что введение НАС оказывает благоприятный эффект на состояние показателей функциональной и метаболической активности АМ, инкубировавшихся в условиях недостатка O_2 и высокой температуры. Под влиянием НАС спустя 2 ч инкубации в условиях 5 % O_2 и 42 °С в них предотвращались перестройка энергетического метаболизма, накопление продуктов катаболизма NO и, частично, — H_2O_2 . Мы полагаем, что этот эффект лежит в основе предотвращения НАС интенсификации процессов перекисного окисления липидов в АМ при недостатке O_2 и повышенной температуре. Присутствие НАС в среде инкубации приводило к увеличению уровня Г-SH на 30 % (относительно значений при 42 °С, 5 % O_2 и в отсутствии добавок), а активность ГП не только не опускалась ниже контрольных значений, но и превышала их на 33,1 %. На контрольном уровне сохранялся источник пополнения НАДФН· H^+ , о чем свидетельствовал лишь 12,4 % рост активности ключевого фермента пентозофосфатного пути окисления глюкозы — Гл-6Ф-ДГ (аналогичная инкубация в отсутствии НАС приводила к практически троекратному увеличению медианы активности). В присутствии НАС сохранялась величина ФП макрофагов. Она была в 2,5 раза выше значений, выявленных при инкубации клеток при 42 °С, 5 % O_2 и в отсутствии НАС. НАС сохранял свой защитный эффект и при более длительном (20 ч) воздействии на АМ низкой концентрации O_2 и повышенной температуры, снижая количество АМ, претерпевающих апоптотическую гибель.

Внесение сукцината в среду инкубации клеток, когда она проводилась в течение 2 ч при 42 °С и 5 % O_2 , оказывало подобный эффект. В его присутствии сохранялась на контрольном уровне активность СДГ и ЛДГ, предотвращалось повышение продукции NO и H_2O_2 , не происходило снижения активности Кат, ГП и уровня Г-SH, не увеличивалась концентрация ТБК-активных продуктов, предотвращалось снижение числа фагоцитирующих АМ. Однако способность сукцината препятствовать изменениям вышеназванных показателей была выражена слабее, чем у НАС.

Инкубация АМ с сукцинатом при 42 °С и 10 % O_2 в течение 20 ч резко увеличивала количество аннексин-V-позитивных АМ, медиана которого повысилась более чем в 8 раз (до 16,15 % всей клеточной популяции). Выраженность этих изменений снижалась в условиях одновременного присутствия в среде инкубации клеток сукцината и НАС. Тогда число апоптотических АМ составило 12,4: 11,8–13,6 % от общего их числа, что превышало контрольные значения, приблизительно, в 6 раз (рисунок 4). Таким образом, сукцинат, при относительно длительной инкубации АМ в условиях 10 % O_2 и 42 °С, проявлял выраженное проапоптотическое действие.

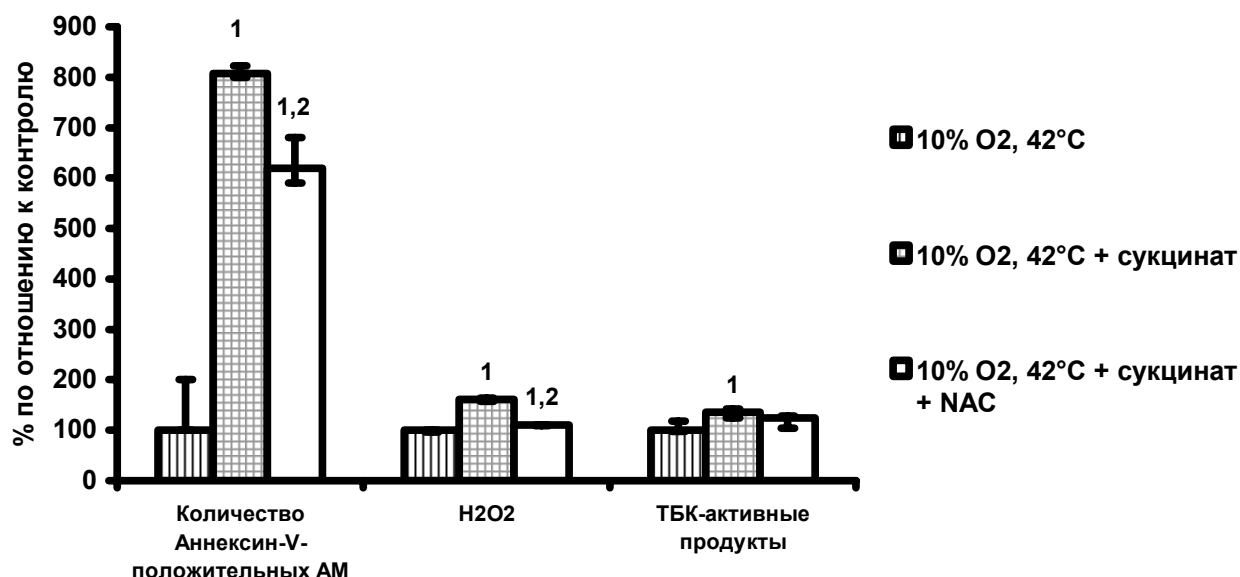


Рисунок 4 – Влияние сукцината (изолированно или комбинированно с NAC) на активность процессов апоптоза и концентрацию пероксида водорода и ТБК-активных продуктов в альвеолярных макрофагах

Примечание. Данные выражены как процентное отношение к контролю (42 °С, 10 % O₂, без добавок); ¹ — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ² — $p < 0,05$ по сравнению со значениями исследуемых показателей в клетках, инкубированных при 42 °С и 10 % O₂ в присутствии только сукцината.

С целью проверки связи обнаруженного эффекта с АФК, был предпринят следующий эксперимент. Сукцинат в той же концентрации, 10⁻⁵ моль/л, вносили в питательную среду АМ перед их инкубацией (20 ч, 42 °С и 10 % O₂), сразу по окончании которой оценивались количество H₂O₂ и уровень ТБК-активных продуктов. В результате (рисунок 4), достоверно увеличилась суммарная (в клетках и среде их инкубации) концентрация H₂O₂ (на 61,1 %). Если же инкубация проводилась в присутствии сукцината и NAC одновременно, то нарастание уровня H₂O₂ было менее выраженным. Подобные изменения были выявлены и для концентрации ТБК-активных продуктов. Внесение сукцината приводило к ее росту на 35,6 %, а одновременное присутствие сукцината и NAC вызывало увеличение лишь на 24,7 %.

Полученные данные убедительно продемонстрировали способность сукцината оказывать как антиоксидантное действие (инкубация 2 ч при 42 °С и 5 % O₂), так и обратный (прооксидантный) эффект (инкубация 20 ч при 42 °С и 10 % O₂). Таким образом, использование сукцината с целью коррекции нарушений функциональной и метаболической активности АМ, вызванных сочетанным воздействием дефицита O₂ и высокой температуры, нецелесообразно, поскольку может усугубить степень поражения клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные данные, представленные в настоящей диссертации, свидетельствуют о том, что сочетанное влияние недостатка кислорода и высокой температуры инкубации на альвеолярные макрофаги отличается от влияния вышеназванных факторов в отдельности. Основные результаты работы можно сформулировать в виде следующих выводов:

1. Низкая концентрация кислорода в окружающем пространстве приводит к перестройке путей катаболизма глюкозы в альвеолярных макрофагах. Снижается активность сукцинатдегидрогеназы и увеличивается — лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы. Рост температуры инкубации клеток сопровождается аналогичными изменениями активности сукцинатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы на фоне отсутствия изменения активности лактатдегидрогеназы. Сочетанное влияние недостатка кислорода и повышенной температуры приводит к еще более выраженному снижению активности сукцинатдегидрогеназы и увеличению — глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы [5, 12, 14].

2. Дефицит кислорода в окружающей среде стимулирует накопление в альвеолярных макрофагах продуктов перекисного окисления липидов, ионов Ca^{2+} , пероксида водорода, нитрит-ионов. Повышение температуры инкубации клеток приводит к аналогичным изменениям, но не влияет на концентрацию нитрит-ионов. Сочетание недостатка кислорода и высокой температуры оказывает суммирующий, еще более выраженный эффект [3, 4, 11, 16, 17, 18, 20, 22].

3. Причиной нарастания концентрации пероксида водорода в альвеолярных макрофагах при повышенной температуре, особенно на фоне дефицита кислорода, является снижение активности каталазы и глутатионпероксидазы, уровня восстановленного глутатиона. Нарастание нитрит-ионов в этих условиях обусловлено активацией индуцибельной NO-синтазы за счет посттрансляционной модификации уже синтезированного фермента. Подъем активности этого же фермента причастен к снижению концентрации восстановленного глутатиона [3, 7, 11, 15, 16, 21].

4. Высокая температура среды, окружающей альвеолярные макрофаги, усиливает подавление их фагоцитарной активности, вызванное кратковременным (2 часа) воздействием недостатка кислорода. Угнетение поглотительной способности альвеолярных макрофагов в указанных условиях не связано с увеличением гибели клеток, поскольку снижение доли кислорода в окружающем пространстве до 10 %, хотя и стимулирует процессы апоптоза, но требует для этого более продолжительного времени. Альвеолярные макрофаги способны адаптироваться к недостатку кислорода. При уменьшении доли кислорода в окружающем пространстве с 10 % до 5 % происходит снижение их апоптоза. Повышение температуры не оказывает влияния на этот феномен [2, 6, 8, 10, 12, 13, 16, 22, 23].

5. Перспективным подходом к коррекции выявленных нарушений является использование N-ацетилцистеина. N-ацетилцистеин предотвращает

или существенно ослабляет изменение показателей метаболизма углеводов, окислительно-антиоксидантного равновесия, функциональной активности и жизнеспособности альвеолярных макрофагов в условиях недостатка кислорода в окружающем пространстве и высокой температуры. Добавление сукцината в качестве антиоксиданта и антигипоксанта в питательную среду для последующей инкубации клеток в течение 2 часов при 5 % кислорода и 42 °С оказывает подобный, но менее выраженный, эффект. Продолжительная инкубация (20 часов) альвеолярных макрофагов с сукцинатом (10 % кислорода, 42 °С) стимулирует накопление в клетках активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов, увеличивает апоптоз [9, 19, 23].

Практическая значимость полученных результатов

Результаты исследования позволяют не только углубить и расширить понимание механизмов влияния гипоксии и лихорадки на альвеолярные макрофаги, но и дают ценную информацию о сочетанном эффекте этих факторов на метаболизм, жизнеспособность и функциональную активность клеток. Влияние высокой температуры и недостатка кислорода, в отдельности, на окисление глюкозы, гомеостаз ионов Ca^{2+} , накопление активных форм кислорода нередко совпадает, и при сочетанном их влиянии возникает потенцированный эффект. Однако имеются и существенные отличия, которые создают в альвеолярных макрофагах качественно новое состояние. В результате, с одной стороны, создаются предпосылки для энергетического кризиса из-за прекращения интенсификации анаэробного пути окисления глюкозы. С другой стороны, несмотря на значительное накопление в альвеолярных макрофагах активных форм кислорода (из-за медленного их катаболизма) и активных форм азота (вследствие активации индуцибельной NO-синтазы), снижения их фагоцитарной активности, в клетках формируется своеобразная адаптивная реакция. Она нивелирует механизмы, ответственные за увеличение гибели альвеолярных макрофагов.

Эти находки, после проведенного анализа, позволили обоснованно использовать N-ацетилцистеин, известный своим антиоксидантным действием для коррекции тех изменений метаболизма, жизнеспособности и фагоцитарной активности, которые доминируют при выраженном дефиците кислорода в окружающей среде (5%) и чрезвычайно высокой температуре (42°C). Сравнительное исследование целесообразности использования антигипоксанта – сукцината с этой же целью дало основание отвергнуть его как потенциально опасное соединение, способное значительно усугубить состояние клеток легких.

Полученные сведения рекомендуется учитывать в терапии легочных заболеваний, сопряженных с развитием дыхательной гипоксии и повышением температуры тела.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в журналах

1. **Лобанова, Е. М.** Роль природных простагландинов и их синтетических аналогов в развитии и предотвращении аллергического воспалительного процесса в легких / **Е. М. Лобанова, А. Д. Таганович** // Белорусский мед. журнал. – 2004. – № 3. – С. 62–65.
2. **Лобанова, Е. М.** Фагоцитарная активность стимулированных альвеолярных макрофагов в условиях гипоксии и гипертермии / **Е. М. Лобанова, А. Д. Таганович** // Белорусский мед. журнал. – 2005. – № 1. – С. 66–68.
3. Исследование влияния высокой температуры на генерацию монооксида азота альвеолярными макрофагами, находящимися в состоянии гипоксии / **Е. М. Лобанова, А. Д. Таганович, Г. А. Холод, М. С. Лучиц** // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2005. – № 2. – С. 10–15.
4. Клеточные механизмы и поиск маркеров развития острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) / **А. Д. Таганович, О. А. Головач, Е. М. Лобанова, А. С. Смирнов** // Буковинський медичний вісник. – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 234–236.
5. **Лобанова, Е. М.** Сочетанное влияние дефицита кислорода и высокой температуры на показатели метаболизма альвеолярных макрофагов / **Е. М. Лобанова, А. Д. Таганович** // Мед. журнал. – 2005. – № 3. – С. 84–87.
6. Механизмы гибели альвеолярных макрофагов, инкубированных в условиях недостатка кислорода и/или высокой температуры / **С. Н. Прохоров, И. А. Карпович, Е. М. Лобанова, Ю. А. Горанова, В. А. Горанов** // Мед. панорама. – 2005. – № 10. – С. 29–30.
7. **Таганович, А. Д.** Особенности метаболизма перекиси водорода в альвеолярных макрофагах крыс в условиях недостатка кислорода и повышенной температуры окружающего пространства / **А. Д. Таганович, Е. М. Лобанова** // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2005. – № 4. – С. 29–33.
8. Интенсивность процессов апоптоза в альвеолярных макрофагах крыс, инкубированных при дефиците кислорода и высокой температуре / **Е. М. Лобанова, Ю. А. Горанова, В. А. Горанов, А. Д. Таганович** // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2006. – № 1. – С. 21–26.
9. **Лобанова, Е. М.** Использование N-ацетилцистеина и сукцината для коррекции арушений метаболизма альвеолярных макрофагов, вызванных воздействием высокой температуры и недостатком кислорода *in vitro* / **Е. М. Лобанова, А. Д. Таганович** // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2006. – № 3. – С. 48–53.

Статьи в сборниках научных работ

10. **Лобанова, Е. М.** Влияние сочетанного действия гипоксии и гипертермии на фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов / **Е. М. Лобанова** // Труды молодых ученых 2004: сб. науч. работ / Белорусский гос. мед. ун-т; под общ. ред. проф. С. Л. Кабака. – Минск, 2004. – С. 77–80.

11. **Лобанова, Е. М.** Состояние оксидантно-антиоксидантного баланса альвеолярных макрофагов в условиях сочетанного действия недостатка кислорода и высокой температуры / **Е. М. Лобанова**, М. С. Лучиц, Г. А. Холод // Труды молодых ученых 2005: сб. науч. работ / Белорусский гос. мед. ун-т; под общ. ред. проф. С. Л. Кабака. – Минск, 2005. – С. 80–83.

12. **Лобанова, Е. М.** Исследование сочетанного воздействия высокой температуры инкубации и недостатка кислорода на функции и метаболизм альвеолярных макрофагов / **Е. М. Лобанова**, А. Д. Таганович // Рецензир. науч.-практ. ежегодник // ГУ Республиканская нац. мед. библиотека. – Минск, 2005. – Вып. X: Достижения медицинской науки Беларуси. – С. 102–103.

Статьи в материалах конференций и конгрессов, тезисы докладов

13. **Лобанова, Е. М.** Влияние сочетанного действия гипоксии и гипертермии на функциональную активность альвеолярных макрофагов / **Е. М. Лобанова** // Актуальные проблемы пульмонологии: тезисы конференции, Минск, 2 декабря 2004 г. / Мед. панорама. – 2004. – № 10. – С. 48–49.

14. **Лобанова, Е. М.** Влияние гипоксии на показатели энергетического метаболизма альвеолярных макрофагов, инкубированных при высокой температуре / **Е. М. Лобанова** // Материалы II международной медико-фармацевтической студентов и молодых ученых, Черновцы, 24–26 марта 2005 г. / Хист (Всеукраинский медицинский журнал молодых ученых). – 2005. – Вып. 7. – С. 97.

15. **Лобанова, Е. М.** Влияние сочетанного воздействия недостатка кислорода и высокой температуры на активность антиоксидантных ферментов альвеолярных макрофагов / **Е. М. Лобанова** // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 57-й итоговой научной конференции студентов и молодых ученых Витебского государственного медицинского университета, Витебск, 21–22 апреля 2005 г. / Витебский гос. мед. ун-т, 2005. – С. 91–93.

16. **Лобанова, Е. М.** Функциональная и метаболическая активность альвеолярных макрофагов в условиях недостатка кислорода и высокой температуры / **Е. М. Лобанова** // Молодежь в науке – 2005: работы, предоставленные на Международную научную конференцию молодых ученых, посвященной Всемирному дню науки во имя мира и развития, Минск, 14–18 ноября 2005 г. / Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2005. – № 5. – С. 21–24.

17. **Лобанова, Е. М.** Дефицит кислорода и перегревание регулируют продукцию альвеолярными макрофагами оксида азота / **Е. М. Лобанова** // Материалы III международной медико-фармацевтической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 20-летию Чернобыльской аварии

(80-й юбилейный научный форум студентов и молодых ученых), Черновцы, 3–5 апреля 2006 г. / Хист (Всеукраинский медицинский журнал молодых ученых). – 2006. – Вып. 8. – С. 116.

18. **Лобанова, Е. М.** Влияние сочетанного действия недостатка кислорода и высокой температуры инкубации на концентрацию свободного внутриклеточного кальция в альвеолярных макрофагах / **Е. М. Лобанова, А. В. Валаханович** // Материалы I международной (X Всероссийской) Пироговской студенческой научной медицинской конференции, Москва, 14 апреля 2006 г. // Вестник Росс. гос. мед ун-та. – 2006. – № 2. – С. 391.

19. **Лобанова, Е. М.** Исследование способов коррекции нарушений функциональной и метаболической активности альвеолярных макрофагов, вызванных сочетанным воздействием гипоксии и гипертермии / **Е. М. Лобанова** // Человек и лекарство: тезисы докладов XIII Российского национального конгресса, Москва, РФ, 3–7 апреля 2006 г. / ООФ «Здоровье человека»; редкол. А. Г. Чучалин, Ю. Б. Белоусов [и др.]. – Москва, 2006. – С. 195–196.

20. **Lobanova, E. M.** The influence of the combination of hypoxia and high temperature on the nitric oxide generation by the alveolar macrophages / **E. M. Lobanova** // Abstracts of the 5-th Parnas conference, Kyiv, Ukraine, April 26–29, 2005 / Ukrainian Biochem. J. – 2005. – Vol. 77, № 2. – P. 203.

21. **Labanava, L. M.** Hydrogen peroxide metabolism in alveolar macrophages after their exposure to hypoxia and hyperthermia / **L. M. Labanava** // Hypoxia in Lung Biology and Disease: final programme (including abstracts) of 4-th ERS Lung Science Conference, Taormina, Sicily, Italy, March 24–26, 2006 / ERS. – 2006. – P. 95–96.

22. Valakhanovich, H. V. The effect of combined hypoxia and hyperthermia on the metabolism of alveolar macrophages / H. V. Valakhanovich, **L. M. Labanava** // Abstracts 31-st FEBS Congress, Istanbul, Turkey, 24–29 June 2006 / The FEBS Journal. – 2006. – Vol. 273, Suppl. 1. – P. 144.

23. Moderate hypoxia coupled with hyperthermia as a trigger of alveolar macrophages apoptosis / A. D. Tahanovich, **L. M. Labanava**, O. A. Golovach, A. S. Smirnov // Annual European Respiratory Society Congress: abstracts of congress, Munich, Germany, 2–6 September 2006 / The ERS Journal. – 2006. – Vol. 28, Suppl. 50. – P. 635S.

РЕЗЮМЕ

Лобанова Елизавета Михайловна

Состояние метаболизма в альвеолярных макрофагах в условиях сниженной концентрации кислорода и повышенной температуры и его коррекция

Ключевые слова: альвеолярные макрофаги (АМ), недостаток кислорода, перегревание, фагоцитоз, оксидантно-антиоксидантный баланс, сукцинат, N-ацетилцистеин.

Цель работы: определить особенности метаболизма, функциональной активности, жизнеспособности альвеолярных макрофагов в условиях низкого содержания кислорода и высокой температуры окружающей среды и обосновать подходы к коррекции выявленных изменений.

Методы исследования: биохимические, статистические.

Использованная аппаратура: центрифуга РС-6 (Киргизия), спектрофотометры СФ-26 и СФ-46 (Россия), флуоресцентный спектрофотометр «Hitachi 650-60» (Япония), проточный флуориметр «FACS Vantage» (США).

Полученные результаты и их новизна. Впервые установлено, что сочетание недостатка O_2 и перегревания увеличивает вероятность развития энергетического кризиса в АМ, способствует усилению продукции H_2O_2 (за счет снижения интенсивности фермент-зависимых процессов ее расщепления) и накоплению продуктов катаболизма оксида азота. Умеренный (10 %) недостаток O_2 значительно увеличивает интенсивность процессов апоптоза, но не некроза в культуре АМ. Усугубление же дефицита O_2 (5 %) проявляется в повышении жизнеспособности АМ по сравнению с 10 %. Высокая температура усиливает вызванное кратковременным воздействием недостатка O_2 подавление поглотительной способности АМ.

Обоснованно использование N-ацетилцистеина для коррекции выявленных нарушений в метаболизме АМ. Одновременно продемонстрирована опасность использования общеизвестного антигипоксанта — сукцината, способного оказывать прооксидантное действие и увеличивать интенсивность апоптоза АМ.

Рекомендации по использованию. Полученные сведения рекомендуется учитывать в терапии легочных заболеваний, сопряженных с развитием дыхательной гипоксии и повышением температуры тела.

Область применения: биохимия, пульмонология.

РЭЗІЮМЭ

Лабанава Лізавета Міхайлаўна Стан метабалізму ў альвеалярных макрафагах ва ўмовах паніжанай канцэнтрацыі кіслароду і павышанай тэмпературы і яго карэкцыя

Ключавыя словы: альвеалярныя макрафагі (АМ), недахоп кіслароду, пераграванне, фагацытоз, аксідантна-супрацьаксідантны баланс, сукцынат, N-ацэтылцыстэін.

Мэта працы: вызначыць асаблівасці метабалізму, функцыянальнай актыўнасці, жыццяздольнасці альвеалярных макрафагаў ва ўмовах нізкай канцэнтрацыі кіслароду і высокай тэмпературы навакольнага асяроддзя і абгрунтаваць падыходы да карэкцыі выяўленых змен.

Метады даследавання: біяхімічныя, статыстычныя.

Выкарыстаная апаратура: цэнтрыфуга РС-6 (Кіргізія), спектрафатометры СФ-26 і СФ-46 (Расія), флюарэсцэнтны спектрафатометр «Hitachi 650-60» (Японія), праточны флюарыметр «FACS Vantage» (ЗША).

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Упершыню вызначана, што спалучэнне недахопу O_2 і перагравання павялічвае верагоднасць развіцця энергетычнага крызісу ў АМ, спрыяе ўзмацненню прадукцыі H_2O_2 (за кошт зніжэння інтэнсіўнасці фермент-залежных працэсаў яе расшчаплення) і накапленню прадуктаў катабалізму аксіду азоту. Умераны (10 %) недахоп O_2 значна павялічвае інтэнсіўнасць працэсаў апаптозу, але не некрозу ў культуры АМ. Узмацненне ж дэфіцыту O_2 (5%) праяўляецца ў павелічэнні жыццяздольнасці АМ у параўнанні з 10 %. Высокая тэмпература ўзмацняе выкліканае кароткачасовым уздзеяннем недахопу O_2 падаўленне паглынальнай здольнасці АМ.

Абгрунтавана выкарыстанне N-ацэтылцыстэіну для карэкцыі выяўленых парушэнняў у метабалізме АМ. Адначасова прадэманстравана небяспечнасць выкарыстання агульнавядомага антыгіпаксанту — сукцыната, які здольны аказваць прааксідантнае дзеянне і павялічваць інтэнсіўнасць апаптозу АМ.

Рэкамендацыі па выкарыстанню. Атрыманыя звесткі рэкамендуецца ўлічваць у тэрапіі легачных хвароб, спалучаных з развіццём дыхальнай гіпаксіі і павышэннем тэмпературы цела.

Галіна выкарыстання: біяхімія, пульманалогія.

SUMMARY

Labanova Lizaveta Michailauna

Status of a metabolism in alveolar macrophages in the conditions of the low oxygen concentration and high temperature and its correction

Key words: alveolar macrophages (AM), oxygen deficiency, overheating, phagocytosis, oxidant-antioxidant balance, succinate, N-acetylcysteine.

Purpose of research: to define features of the metabolism, functional activity, viability of alveolar macrophages in the conditions of low ambient oxygen concentration and high temperature and to prove the approaches to the correction of the revealed changes.

Methods of research: biochemical, statistical.

Equipment: centrifuge PC-6 (Kirghizia), spectrophotometers SPH-26 and SPH-46 (Russia), fluorescent spectrophotometer «Hitachi 650-60» (Japan), streaming fluorimeter «FACS Vantage» (USA).

The received results and their novelty. For the first time is established, that the combined action of the O₂ lack and overheating extends the probability of development of the power crisis in AM, promotes the augmented H₂O₂ production (due to reduction of the intensity of its decomposition by enzyme-dependent processes) and the accumulation of nitrogen oxide catabolism products. The moderate (10 %) O₂ deficiency sharply increases apoptosis, but not necrosis in culture of AM. The aggravation of O₂ deficiency (5 %) causes the increase in AM viability in comparison with 10 %. The heat amplified the suppression of AM phagocytic ability caused by short-term influence of O₂ lack.

Is grounded the use of N-acetylcystein for the correction of revealed disturbances in AM metabolism. Simultaneously is shown the danger of use well-known antihypoxant — succinate, as it renders the prooxidant action and increases the apoptosis of AM.

Recommendations on use. Received data are recommended to be considered in the therapy of the pulmonary diseases connected with the development of respiratory hypoxia and high body temperature.

The field of application: biochemistry, pulmonology.

Подписано в печать _____. Формат 60×84/16. Бумага писчая «КюмЛюкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. _____ Уч.-изд. л. _____. Тираж _____ экз. Заказ _____.

Издатель и полиграфическое исполнение –

белорусский государственный медицинский университет

ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.

220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 6.