

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 577.121:612.112.95.014.46

**ДЕВИНА**  
**Елена Анатольевна**

**ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ  
ПЕРЕСТРОЙКА АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ  
ПОД ВЛИЯНИЕМ СИГАРЕТНОГО ДЫМА  
И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск 2011

Работа выполнена в УО «Белорусский государственный медицинский университет»

**Научный руководитель:** **Таганович Анатолий Дмитриевич**,  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии УО «Белорусский государственный медицинский университет»

**Официальные оппоненты:** **Лелевич Владимир Валерианович**,  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии УО «Гродненский государственный медицинский университет»

**Буко Вячеслав Ульянович**,  
доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биохимической фармакологии ГУ НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»

**Оппонирующая организация:** ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Защита состоится 11 ноября 2011 г. в 14.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.02 при УО «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, тел.: (017) 272-55-98, e-mail: rector@bsmu.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций,  
кандидат медицинских наук, доцент



А. И. Герасимович

## ВВЕДЕНИЕ

В Беларуси от болезней, связанных с курением, ежегодно умирают 15,5 тыс. человек [Наройчик Л., 2010]. Средняя потеря продолжительности жизни курящих белорусов составляет 18 лет, а для возраста 35–69 лет – 21 год.

Бронхо-легочная система в первую очередь, подвергается воздействию табачного дыма. Вдыхание табачного дыма потенциально увеличивает риск заболевания раком, пневмонией, хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), способствует развитию эмфиземы. За последние годы достигнут значительный прогресс в понимании морфологической сущности процессов, лежащих в основе развития большинства этих заболеваний. Остаются непонятными молекулярные механизмы развития ХОБЛ.

Исследование компонентов, содержащихся в табачном дыме, показало, что при горении табака имеет место цепная химическая реакция с участием активных форм кислорода (АФК) [Pryor W.A., 1993; Stone K., 1994]. Экзогенным (табачным) радикалам отводится главная роль в развитии ХОБЛ. При этом недооценивается значение эндогенных (клеточных) АФК, образующихся при контакте субмикроскопических частиц смол и других твердых продуктов табачного дыма с клетками.

Полагают, что в формировании воспалительного процесса в воздухопроводящих путях активное участие принимают альвеолярные макрофаги (АМ) [Aoshiba K., 2001; Rahman I., 2006; Taylor A.E., 2010]. В частности, активируясь, АМ продуцируют повышенное количество АФК, различные цитокины, эйкозаноиды и другие медиаторы воспаления [Barnes P.J., 2004; Yoshida T., 2007]. Тем самым к месту их нахождения привлекаются лимфоциты, нейтрофилы и фибробласты, которые, в свою очередь, активируются для дальнейшего роста, размножения и функционирования. Однако к началу нашей работы имелись противоречия относительно влияния сигаретного дыма на функциональную активность АМ, образование и катаболизм АФК именно в этих клетках. Не изученными оставались зависимость показателей этих процессов от концентрации сигаретного дыма, длительности его контакта с АМ. Предшествующие нашей работе данные позволяли осмыслить значимость АФК в развитии ХОБЛ. Они составили основу **рабочей гипотезы** для настоящего исследования. Предполагалось, что смолы табачного дыма, контактируя с АМ в нижних отделах дыхательных путей, снижают их жизнеспособность и фагоцитарную активность в зависимости от дозы и длительности контакта. В частности, нарушение способности к обезвреживанию поглощенного материала происходит за счет ингибирования соответствующих ферментных систем. Накопление АФК причастно к нарушению функ-

циональной способности АМ и нуждается в коррекции. Эффективным средством для этого могут быть природные антиоксиданты.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с крупными научными программами и темами.** Диссертация выполнялась в рамках научно-исследовательской работы кафедры биологической химии УО «Белорусский государственный медицинский университет»: «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 2004–2012 гг., а также в рамках научно-исследовательского проекта «Исследовать влияние смол сигаретного дыма на функциональную активность и показатели метаболизма клеток легких» по договору № Б09-010 от 15.04.2009 г. с Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований, номер гос. регистрации 20091535, сроки выполнения 2009–2011 гг.

**Цель исследования:** установить особенности окислительного метаболизма, функциональной активности и жизнеспособности альвеолярных макрофагов при контакте с сигаретным дымом и сравнительную эффективность антиоксидантов по предотвращению выявленных изменений.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить влияние сигаретного дыма и активных форм кислорода на фагоцитарную активность, жизнеспособность изолированных альвеолярных макрофагов.

2. Определить способность альвеолярных макрофагов к индукции активных форм кислорода и азота, продуктов окисления липидов и белков в результате контакта с экстрактом сигаретного дыма.

3. Оценить активность ферментов антиоксидантной защиты после контакта альвеолярных макрофагов с экстрактом сигаретного дыма.

4. Определить способность N-ацетилцистеина, куркумина, кверцетина, резвератрола, эпигаллокатехин галлата корректировать изменения функциональных параметров и окислительно-антиоксидантного состояния альвеолярных макрофагов, развившиеся в результате контакта клеток с сигаретным дымом.

**Объект исследования:** изолированные альвеолярные макрофаги крыс, культивируемые в питательной среде, обогащенной сигаретным дымом.

**Предмет исследования:** показатели фагоцитарной активности и жизнеспособности альвеолярных макрофагов; показатели, характеризующие

уровень активных форм кислорода, азота, окисления липидов и белков, состояние антиоксидантной защиты в альвеолярных макрофагах; показатель активации процессов транскрипции генов провоспалительных цитокинов в альвеолярных макрофагах.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. В результате контакта с экстрактом сигаретного дыма снижается жизнеспособность альвеолярных макрофагов и их фагоцитарная активность, наблюдается уменьшение числа фагоцитирующих клеток и количества поглощенных ими микроорганизмов. Наиболее выраженные изменения, более чем в 2 раза, имеют место при наибольшей из изучаемых концентраций экстракта сигаретного дыма и при продолжительном контакте с ним альвеолярных макрофагов [1, 3, 4, 13, 14].

2. Экстракт сигаретного дыма активирует процессы свободнорадикального окисления в макрофагах легких, снижая активность антиоксидантной системы: уменьшается концентрация нитрит-ионов, количество небелковых соединений, содержащих SH-группу, активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатионпероксидазы (ГПО); увеличивается количество пероксида водорода, ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков в альвеолярных макрофагах. Степень изменения более выражена при длительном контакте клеток с экстрактом сигаретного дыма. Имеет место увеличение количества транскрипционного фактора NF-κB в ядерной фракции альвеолярных макрофагов [2, 3, 11, 12, 15–17].

3. Антиоксидантное действие N-ацетилцистеина (N-АЦ), куркумина, резвератрола, эпигаллокатехин галлата (ЭГКГ) и кверцетина в концентрации  $10^{-5}$  моль/л на интактные альвеолярные макрофаги проявляется в снижении концентрации пероксида водорода, нитрит-ионов, карбонильных производных белков (только N-ацетилцистеин), повышении активности глутатионпероксидазы, каталазы (за исключением кверцетина), супероксиддисмутазы (за исключением N-ацетилцистеина и кверцетина) и уровня небелковых SH-соединений. Фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов повышается при применении N-ацетилцистеина, куркумина и эпигаллокатехин галлата, тогда как прединкубация альвеолярных макрофагов с резвератролом или кверцетином угнетает эту функцию [5, 7, 8, 9, 10, 18].

4. Использование антиоксидантов способствует нормализации метаболических и функциональных изменений в альвеолярных макрофагах, вызванных кратковременным (1 ч) воздействием сигаретного дыма с минимальной концентрацией смол, тогда как повышение концентрации смол и увеличение времени контакта клеток с экстрактом сигаретного дыма ограничивает эффективность антиоксидантов (вплоть до полной потери антиради-

кальной активности или изменения направленности действия). Эпигаллокатехин галлат и N-ацетилцистеин по способности корректировать изменения в АМ, возникающие в результате контакта альвеолярных макрофагов с экстрактом сигаретного дыма, превосходят резвератрол, кверцетин и куркумин [5, 7–10, 18].

**Личный вклад соискателя.** Работа выполнена соискателем самостоятельно на базе кафедры биологической химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет». Тема диссертации, постановка цели и задач исследования, определение объема исследований, анализ полученных результатов, подготовка печатных работ к публикации проводились совместно с научным руководителем, доктором медицинских наук, профессором, заведующим кафедрой биологической химии УО «Белорусский государственный медицинский университет» А.Д. Тагановичем.

Автором проведен анализ научной литературы, освоены методики и получены приведенные в диссертации результаты (личное участие 100%). Автором выполнен анализ и обобщение полученных результатов (личное участие 90%), проведена их компьютерная графическая и статистическая обработка (личное участие 100%), данные изложены в статьях [1–5, 7–9, 11, 17] и тезисах докладов [12–16, 18] (личное участие 85%). Соавтор публикаций оказывал помощь в организации и проведении исследований (Принькова Т.Ю.). АМ из бронхоальвеолярной лаважной жидкости (356 крыс) получены соискателем лично (участие 100%). Автор самостоятельно осуществляла культивирование клеток, получала экстракт сигаретного дыма и твердую фазу сигаретного дыма, выделяла цитоплазматическую и нуклеарную фракции альвеолярных макрофагов, определяла показатели метаболизма в АМ и их фагоцитарную активность (личное участие 100%). Техническую помощь при проведении блот-анализа оказывали сотрудники научной группы «Иммунология» лаборатории биохимических методов исследования ЦНИЛ УО «БГМУ». Автором обоснована целесообразность и установлена сравнительная эффективность использования антиоксидантов для предотвращения повреждения клеток легких (личный вклад соискателя 95%). Сравнительные характеристики антиоксидантов изложены в статьях и материалах конференций [5, 7–9, 18] – вклад соискателя 90%. Полученные результаты используются в клинике и научных подразделениях Республиканского научно-практического центра фтизиатрии и пульмонологии МЗ РБ и внедрены в учебный процесс 1-ой кафедры внутренних болезней УО «БГМУ» и кафедры биологической химии УО «БГМУ», что подтверждено актами внедрения.

**Апробация результатов диссертации.** Включенные в диссертацию результаты исследований доложены и обсуждены на республиканской конфе-

ренции «Достижения современной биологии, химии и медицины» (г. Минск, 2009 г.), Республиканской научно-практической конференции, посвященной 90-летию Министерства здравоохранения РБ (г. Минск, 2009 г.), III Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2009» (Санкт-Петербург, РФ, 2009 г.), конференции «Патогенез социально значимых заболеваний человека» (г. Минск, 2010 г.), III Международном медицинском конгрессе «MedEspra» (г. Кишинев, Республика Молдова, 2010 г.), VIII Международной конференция «Биоантиоксидант» (г. Москва, РФ, 2010 г.), ежегодных научных сессиях БГМУ (г. Минск, 2009, 2010, 2011 гг.).

**Опубликованность результатов.** По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ: в том числе 10 статей в рецензируемых научных изданиях, (3 – в зарубежных журналах, 1 – в моноавторстве), 3 – в рецензируемых сборниках научных трудов, 5 тезисов докладов в материалах конференций (из них 3 – в зарубежных). Общий объем опубликованных материалов по теме диссертации составил 6,5 авторских листа (из них лично соискателем 3,9).

**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 247 источников литературы (19 – на русском, 228 – на английском языке) и списка публикаций соискателя – 18 работ, приложения. Работа содержит 17 таблиц и 16 рисунков, изложена на 141 страницах печатного текста (основной текст – 96 страниц, таблицы и рисунки – 23, списки использованных источников и публикаций соискателя – 22 страниц).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Экспериментальное исследование проведено *in vitro* на изолированных АМ крыс и выполнено с соблюдением этических норм обращения с животными на белых нелинейных крысах-самцах, массой 180–230 г. Экспериментальная модель повреждения клеток легких сигаретным дымом позволила варьировать концентрацию и длительность воздействия сигаретного дыма на АМ, исключить влияние на клетки других факторов.

Экстракт сигаретного дыма (ЭСД) был получен методом пропускания дыма от десяти сигарет («Корона», Беларусь; содержание смол в 1 сигарете – 14 мг, никотина – 1 мг, скорость пропускания 1 сигарета/мин) через 100 мл среды Игла, модифицированной Дульбекко (ДМЕМ) с использованием ав-

томатического вакуумного насоса. Стандарт ЭСД, соответствующий значению оптической плотности ( $OD\ 1,0 \pm 0,1$ ) при длине волны 320 нм, рН 7,4 принимался за 100%. Концентрации ЭСД – 10; 20 и 30% получали путем разведения, стерилизовали с применением бактериального фильтра (диаметр пор 0,22 мкм). Для получения твердой фазы сигаретного дыма (ТФСД) дым от 20 сигарет с использованием вакуумного насоса пропускали через стекловолоконный фильтр, осадок на фильтре промывали ацетоном (15 мл), испаряли в струе азота. Осадок взвешивали, растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и хранили в запаянных ампулах при температуре  $-20\ ^\circ\text{C}$ .

АМ получали из бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Для этого в изолированные и обескровленные легкие через трахею вводили и забирали физиологический раствор, рН 7,4, температура  $37\ ^\circ\text{C}$ . БАЛЖ фильтровали и центрифугировали 10 мин, 900 об/мин, при температуре  $+4\ ^\circ\text{C}$ . Клеточный осадок ресуспендировали. 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  $37\ ^\circ\text{C}$  в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием  $\text{CO}_2$ .

Для изучения влияния препаратов, обладающих антиоксидантной активностью, использовали N-ацетилцистеин, кверцетин, куркумин, резвератрол и ЭГКГ в концентрации  $10^{-5}$  моль/л. АМ инкубировали 120 мин с добавлением антиоксидантов (АО), после чего среду меняли на ДМЕМ, обогащенную ЭСД, или добавляли 20 мкл ТФСД с концентрацией смол 0,7; 1,4 и 2,1 г/л и продолжали инкубацию в течение 1–20 ч при температуре  $37\ ^\circ\text{C}$  в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием  $\text{CO}_2$ . В качестве контроля среды, ДМЕМ, обогащенную сигаретным дымом (СД), инкубировали без клеток или вносили 20 мкл ДМСО. Клетки снимали скрепером, клеточную суспензию гомогенизировали.

Влияние ЭСД и ТФСД на жизнеспособность оценивали по окраске трипановым синим и по высвобождению из клеток цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) кинетическим методом. Активность фагоцитоза АМ изучали путем добавления бактериальной суспензии *Staphylococcus aureus* ( $500 \times 10^6$ /мл). Определяли фагоцитарный показатель (ФП) и фагоцитарное число (ФЧ). Генерацию активных форм кислорода и азота АМ оценивали путем спектрофотометрического определения концентрации пероксида водорода (Gallati H., Pracht I., 1985) и нитрит-ионов (Green L.C., 1982) в среде инкубации и в клетках. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в АМ изучали по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Гончаренко М.С., 1985); окислительную модификацию белков (ОМБ) – по уровню карбонильных производных (Levine R., 1990). Оценивали активность каталазы (Королук М.А., 1988), СОД (Кос-



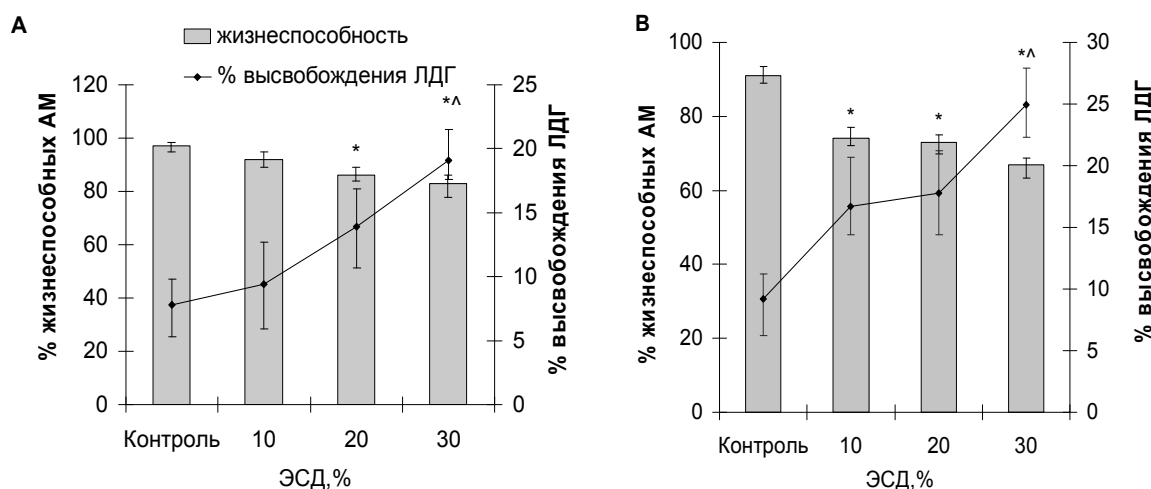
тук В.А., 1990), ГПО (Моин В.М., 1986). Внутриклеточный уровень небелковых SH-соединений в АМ определяли по методу Sedlak J. (1968). Определяли содержание субъединицы р65 ядерного транскрипционного фактора κВ (NF-κВ) методом вестерн-блоттинга в цитоплазматической и ядерной фракции АМ с последующим денситометрическим анализом.

Статистический анализ проводили непараметрическими методами с использованием программ «Microsoft Excel 2007» и «Statistica 6.0». Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. Различия между группами выявляли с помощью U-теста Манна–Уитни.

### Результаты собственных исследований

#### Влияние экстракта сигаретного дыма на жизнеспособность и фагоцитарную активность АМ

В результате контакта с ЭСД альвеолярные макрофаги теряют жизнеспособность. Потеря жизнеспособности АМ нарастает по мере увеличения концентрации ЭСД и длительности его контакта с клетками (рисунок 1).



**Рисунок 1 – Результаты теста с трипановым синим и высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из альвеолярных макрофагов после 1 ч (А) и 20 ч (В) контакта клеток с экстрактом сигаретного дыма**

Примечание – Контроль – АМ инкубировали без ЭСД; \* – достоверность различий  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; ^ – достоверность различий  $p < 0,05$  по сравнению с 10% ЭСД; n = 6.

Подобные закономерности изменения жизнеспособности АМ, отмеченные как результат контакта клеток с ЭСД, полностью воспроизводятся смолами твердой фазы СД и пероксидом водорода в концентрации не менее  $10^{-3}$  моль/л. Эти данные свидетельствуют о значимости АФК в механизме (ах) влияния сигаретного дыма на альвеолярные макрофаги.

Присутствие ЭСД в среде инкубации АМ приводит к снижению фагоцитарной активности этих клеток, которое заключается как в снижении ко-

личества фагоцитирующих макрофагов, так и количества поглощенных ими микроорганизмов, о чем свидетельствует уменьшение ФП на 14,6; 28,1 и 33,4% и ФЧ на 17,5; 23,8 и 24%, соответственно концентрации ЭСД (10; 20 и 30%) при контакте клеток в течение 1 ч с ЭСД. Наиболее выраженное снижение фагоцитарной активности под влиянием ЭСД происходило после контакта с ним АМ в течение 20 ч; количество фагоцитирующих клеток уменьшилось на 35,2; 41,1 и 43,5%, по сравнению с контролем, соответственно возрастающей концентрации ЭСД ( $p < 0,05$ ). Количество поглощённых *St. aureus* одним АМ уменьшилось в 2,4 раза, при этом степень снижения не зависела от концентрации ЭСД.

Пероксид водорода в концентрации  $10^{-3}$  моль/л, контактируя с АМ, также приводит к снижению фагоцитарной активности. При этом длительность контакта клеток с  $H_2O_2$  не имеет столь существенного значения, за исключением обстоятельства, что при 20 ч их совместной инкубации явственным становится двухфазный характер изменения фагоцитарной активности от концентрации  $H_2O_2$ ; в качестве первой фазы выступает увеличение фагоцитарной активности при минимальной из используемых ( $10^{-6}$  моль/л) концентрации  $H_2O_2$ . При концентрации  $10^{-3}$  моль/л  $H_2O_2$  поглощательная способность клеток заметно угнетается.

#### **Показатели окислительного метаболизма в альвеолярных макрофагах, контактировавших с сигаретным дымом**

Контакт АМ с ЭСД приводит к увеличению в клетках количества пероксида водорода. Нарастание  $H_2O_2$  тем больше, чем более концентрированный ЭСД контактирует с АМ, хотя выраженные изменения этого показателя происходят уже при минимальной концентрации ЭСД (10%). Длительность контакта не оказывает существенного влияния на рост  $H_2O_2$ . Суммарное содержание  $H_2O_2$  возросло на 50% в течение 20 ч инкубации АМ с 10% ЭСД. Контакт с ЭСД сопровождается значительным накоплением в АМ продуктов свободно-радикального окисления: ТБК-активных продуктов и карбонильных производных белков. Выраженность их накопления возрастает по мере увеличения концентрации ЭСД и длительности контакта с ним.

При инкубации в течение 20 ч АМ с 30% ЭСД уровень продуктов ПОЛ был максимальным. Содержание карбонильных производных белков повышалось в 2 раза в АМ, контактировавших с 10%, и в 2,5 раза – с 30% ЭСД. Удлинение инкубации увеличивало этот показатель в 7 раз в сравнении с контролем. ЭСД вызывает угнетение активности СОД, каталазы, ГПО. Для кратковременного контакта с ЭСД характерно постепенное снижение активности всех трех изучаемых ферментов (таблица 1). Хотя активность СОД через 1 ч инкубации с 10% ЭСД не отличалась от контроля, повышение концентрации ЭСД с 20% до 30 % вызывало снижение активности СОД.

Таблица 1 – Показатели свободнорадикального метаболизма в альвеолярных макрофагах, контактировавших с сигаретным дымом

Показатели	Условия инкубации – 1 ч				Условия инкубации – 20 ч			
	Контроль	10% ЭСД	20% ЭСД	30% ЭСД	Контроль	10% ЭСД	20% ЭСД	30% ЭСД
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , нмоль/10 <sup>6</sup> клеток, n = 6	4,48 3,60–4,74	6,82 <sup>1</sup> 6,44–7,20	7,80 <sup>1,2</sup> 7,36–8,14	9,64 <sup>1,2,3</sup> 7,80–10,20	4,80 4,46–5,42	7,20 <sup>1</sup> 6,26–7,46	7,42 <sup>1</sup> 7,40–8,26	8,60 <sup>1,2,3</sup> 8,28–9,64
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , нмоль/10 <sup>6</sup> клеток, n = 6	4,26 3,76–4,61	3,88 3,25–4,26	3,20 <sup>1</sup> 3,20–3,60	2,90 <sup>1,2,3</sup> 2,70–3,10	8,84 8,66–9,13	3,66 <sup>1</sup> 3,24–4,36	5,42 <sup>1,2</sup> 5,22–5,66	5,83 <sup>1,2,3</sup> 5,46–6,22
ТБК-активные продукты, нмоль /10 <sup>6</sup> клеток, n = 6	0,95 0,80–1,10	1,15 0,90–1,20	1,20 <sup>1</sup> 1,10–1,30	1,80 <sup>1,2,3</sup> 1,50–1,90	1,10 1,10–1,20	1,80 <sup>1</sup> 1,60–2,20	2,20 <sup>1</sup> 1,80–2,30	2,75 <sup>1,2,3</sup> 2,60–2,90
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка, n = 6	1,1 0,9–1,3	2,1 <sup>1</sup> 1,8–3,1	–	2,8 <sup>1,2</sup> 1,9–3,9	1,2 1,0–1,4	7,2 <sup>1</sup> 6,8–8,6	–	8,4 <sup>1</sup> 6,9–8,9
Соединения, содержащие SH-группу, нмоль/мг белка, n = 6	12,20 11,50–16,40	10,20 <sup>1</sup> 9,80–10,70	9,20 <sup>1,2</sup> 9,00–9,40	8,90 <sup>1,2</sup> 8,70–9,00	10,60 10,00–10,90	6,30 <sup>1</sup> 5,95–6,55	6,30 <sup>1</sup> 6,05–6,55	5,80 <sup>1</sup> 5,25–6,25
СОД, мЕ/мг белка, n = 10	8,80 8,30–9,30	8,05 6,90–8,80	7,65 <sup>1</sup> 6,50–8,20	7,20 <sup>1</sup> 6,20–7,40	9,00 8,80–9,70	3,40 <sup>1</sup> 3,00–4,55	3,30 <sup>1</sup> 2,30–3,80	3,10 <sup>1</sup> 2,40–3,80
Каталаза, мЕ/мг белка, n = 10	108,0 104,0–110,4	77,7 <sup>1</sup> 68,8–84,2	68,8 <sup>1</sup> 57,0–71,6	55,1 <sup>1,2</sup> 53,0–67,2	109,0 93,0–118,0	42,2 <sup>1</sup> 38,0–44,8	41,0 <sup>1</sup> 36,0–43,2	39,5 <sup>1</sup> 37,5–41,1
ГПО, нмоль/мин/мг белка, n = 10	64, 59,2–66,1	52,2 <sup>1</sup> 51,7–56,3	50,1 <sup>1</sup> 43,2–55,3	45,0 <sup>1,2</sup> 41,0–48,6	65,0 60,0–68,2	35,2 <sup>1</sup> 33,3–36,2	31,8 <sup>1</sup> 27,8–34,6	27,1 <sup>1,2,3</sup> 22,8–29,4

Примечание – Данные представлены как медиана: 25%–75%; <sup>1</sup> – p<0,05 по сравнению с контролем; <sup>2</sup> – p<0,05 по сравнению с 10% ЭСД, <sup>3</sup> – p<0,05 по сравнению с 20% ЭСД.

Контакт в течение 20 ч приводит к более выраженному снижению активности ферментов уже при 10% ЭСД. Для СОД и каталазы последующее увеличение концентрации ЭСД, контактирующего с АМ, не сопровождается дальнейшим угнетением активности, а для ГПО это имеет место: степень снижения по сравнению с контролем составила 45,6% при 10% ЭСД и 58,1% при 30% ЭСД. Продолжительная инкубация клеток приводит к уменьшению концентрации небелковых соединений, содержащих SH-группу (12,2: 11,8–16,4 нмоль/мг белка после инкубации интактных АМ в течение 1 ч и 10,6: 10,0–10,9 нмоль/мг белка после – 20 ч). Контакт с ЭСД усиливает эту тенденцию: на 16,3; 24,5 и 28,8% снижается содержание SH-соединений в АМ при инкубации в течение 1 ч с ЭСД, соответственно росту концентрации ЭСД. Длительный контакт клеток (20 ч) с ЭСД вызывал снижение на 40,5%, по сравнению с контролем, независимо от концентрации ЭСД.

### **Влияние экстракта сигаретного дыма на концентрацию нитрит-ионов и содержание NF-κB фактора в АМ**

ЭСД по мере увеличения концентрации и длительности инкубации индуцирует прогрессирующее нарастание количества нитрит-ионов в среде для культивирования АМ. При 10% ЭСД концентрация  $\text{NO}_2^-$  составила (медиана: 25%–75%) – 15,6: 13,8–17,1 мкмоль/л, при 30% ЭСД – 36,2: 33,6–44,0 мкмоль/л. Через 20 ч инкубации содержание  $\text{NO}_2^-$  в 30% ЭСД повышалось до 43,2: 38,8–45,2 мкмоль/л. Альвеолярные макрофаги при инкубации в такой среде уменьшают в ней уровень  $\text{NO}_2^-$ . Длительная инкубация альвеолярных макрофагов с ЭСД уменьшает концентрацию  $\text{NO}_2^-$  в среде, по сравнению с уровнем  $\text{NO}_2^-$  в среде, обогащенной ЭСД, и не содержащей клеток, на 63,4%, независимо от концентрации. При инкубации с ЭСД в течение 1 ч имеет место снижение концентрации нитрит-ионов в АМ. Через 20 ч концентрация  $\text{NO}_2^-$  в альвеолярных макрофагах нарастает по мере увеличения концентрации ЭСД, но не достигает контрольного уровня.

Через 18 ч совместной инкубации ЭСД (10%) с АМ в ядрах клеток увеличивается количество дискретной субъединицы p65 ядерного фактора NF-κB на 69,7% по сравнению с контрольным уровнем (18,40: 12,14–19,55 Ед/мкг), составив 31,23: 20,60–33,17 Ед/мкг ( $p < 0,05$ ). Это свидетельствует об активации ядерного фактора регуляции транскрипции. При этом концентрация общего белка под воздействием ЭСД снижалась 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 p65 в цитозольной фракции макрофагов, подвергнутых контакту с ЭСД, не выявлялся.

## **Коррекция функциональных изменений и показателей оксидантно-антиоксидантной системы в АМ, контактировавших с сигаретным дымом**

*Влияние N-ацетил-L-цистеина на последствия контакта АМ с экстрактом сигаретного дыма.* N-ацетилцистеин, контактируя с АМ, увеличивает их фагоцитарную активность (ФП увеличился на 10% и отмечалась тенденция к повышению ФЧ). Концентрация соединений, содержащих SH-группу, выросла на 14,8 и 27,3% соответственно 1 и 20 ч инкубации. На 19,6% увеличилась активность каталазы, ГПО на – 15,7%. Снижалась концентрация  $H_2O_2$  и нитрит-ионов в АМ. Эти изменения проявляются в первый час после контакта с N-ацетилцистеином. В дальнейшем они или не имеют развития, или исчезают.

N-АЦ препятствовал снижению фагоцитарной активности АМ, уровня небелковых SH-соединений, росту количества  $H_2O_2$  и снижению активности антиоксидантных ферментов, концентрации нитрит-ионов в АМ в условиях воздействия ЭСД в течение 1 ч. Активность ГПО и количество небелковых SH-соединений в клетках, обработанных N-АЦ и контактировавших с 10% ЭСД, не отличались от контроля. Концентрация  $NO_2^-$  в интактных АМ снижалась на 17,2% после прединкубации их с N-АЦ ( $p < 0,05$ ), тогда как в АМ, подвергнутых инкубации с ЭСД, если ей предшествовала обработка N-АЦ, отмечался дозозависимый прирост  $NO_2^-$ . Количество  $H_2O_2$  уменьшалось на 20% и на 23,9%, соответственно 10 и 30% ЭСД, по сравнению с АМ, необработанными N-АЦ. Продолжительный контакт клеток с ЭСД минимизирует протекторное действие N-АЦ.

*Влияние куркумина на последствия контакта АМ с ЭСД.* Куркумин повышал фагоцитарную активность интактных альвеолярных макрофагов. ФП и ФЧ спустя 1 ч инкубации увеличились в 1,5 раза. Такая же закономерность сохранялась через 20 ч инкубации. Куркумин оказывал антиоксидантное действие: увеличивалась активность ГПО и каталазы, снижался уровень нитрит-ионов,  $H_2O_2$  и ТБК-активных продуктов. Концентрация небелковых SH-соединений в АМ под влиянием куркумина сначала (1 ч инкубации) снижалась, а затем (20 ч инкубации) увеличивалась. В условиях кратковременного воздействия сигаретного дыма обработка АМ куркумином препятствовала снижению фагоцитарной активности и росту количества  $H_2O_2$ , ТБК-активных продуктов ПОЛ. Через 1 ч инкубации АМ с ЭСД в клетках снижалось количество  $NO_2^-$  на 38,8% и 50,0% (соответственно 10 и 30% ЭСД). При длительном контакте АМ с сигаретным дымом куркумин изменял направленность своего действия и оказывал выраженный прооксидантный эффект: стимулировал накопление в клетках  $H_2O_2$ , продуктов ПОЛ и не оказывал влияния на сниженную

активность каталазы в макрофагах, контактировавших с ЭСД. Через 20 ч инкубации с ЭСД активность ГПО была ниже в клетках, обработанных куркумином и контактировавших с ЭСД, по сравнению с клетками, контактировавшими с ЭСД, но не обработанными куркумином.

***Влияние резвератрола, эпигаллокатехин галлата на показатели оксидантно-антиоксидантного состояния, фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов, контактировавших с экстрактом сигаретного дыма.*** Резвератрол (в отличие от ЭГКГ) угнетает фагоцитарную активность интактных АМ. Оба антиоксиданта, независимо от длительности последующей инкубации, не оказывали влияния на уровень карбонильных производных белков и ТБК-активных продуктов ПОЛ в интактных АМ, но снижали уровень катаболитов оксида азота,  $H_2O_2$  и стимулировали активность антиоксидантных ферментов. Содержание соединений с SH-группой в АМ, обработанных ЭГКГ или резвератролом, через 1 ч инкубации не отличалось от уровня этого показателя в АМ, не обработанных антиоксидантом. Длительная инкубация сопровождалась статистически значимым повышением концентрации SH-содержащих соединений, составив после обработки резвератролом 12,6: 11,8–12,9 нмоль/мг белка, ЭГКГ – 13,6: 13,2–13,8 нмоль/мг белка; контроль – 11,1: 10,7–11,5 нмоль/мг белка.

При контакте в течение 1 ч с 10% ЭСД в клетках, обработанных ЭГКГ, фагоцитарный показатель и фагоцитарное число не отличались от контрольных значений (когда клетки инкубировались без ЭСД или антиоксидантов). Для АМ, которые до контакта с ЭСД прединкубировались с резвератролом, медианы ФП и ФЧ не отличались от такового в клетках, подвергнутых инкубации с ЭСД, но без предварительной инкубации с резвератролом. Имела место более низкая концентрация окисленных производных белков в АМ, подвергнутых обработке антиоксидантами и контактировавшими с ЭСД (10% и 30%). В случае ЭГКГ уровень таких белков не отличался от контрольного. В интактных АМ, обработанных резвератролом или ЭГКГ, концентрация  $H_2O_2$  была ниже, чем в контроле, при этом контакт с 10% ЭСД в течение 1 ч клеток, предварительно обработанных ЭГКГ, не вызывал достоверного повышения  $H_2O_2$ . Резвератрол и ЭГКГ препятствовали снижению активности каталазы и ГПО в клетках, инкубированных в течение 1 ч с 30% ЭСД, хотя контрольный уровень активности не был достигнут. При более длительной инкубации особенность заключалась в том, что концентрация  $H_2O_2$ , карбонильных производных белков и продуктов ПОЛ была или такой же, как в клетках, необработанных антиоксидантами (ЭГКГ, 10% ЭСД), или даже выше (резвератрол, 30% ЭСД). В клетках, обработанных ЭГКГ, активность ГПО и каталазы оставалась сниженной под влиянием ЭСД, а в клетках, обработанных резвератролом и контактировавших с ЭСД, активность

каталазы и ГПО была еще более низкой, чем в клетках без резвератрола, но контактировавших с ЭСД.

***Влияние кверцетина на фагоцитарную активность и показатели оксидантно-антиоксидантного состояния АМ, контактировавших с ЭСД.*** Кверцетин снижал фагоцитарную активность интактных АМ, и не предотвращал снижения ФП и ФЧ при контакте клеток с ЭСД (10% и 30%). Кверцетин снижал количество  $H_2O_2$  и  $NO_2^-$  и повышал активность ГПО в интактных АМ как при кратковременной, так и при длительной инкубации. Подобно куркумину кверцетин сначала уменьшал в АМ концентрацию небелковых SH-содержащих соединений, в дальнейшем она увеличивалась и превышала контрольный уровень. В клетках, обработанных кверцетином, количество  $H_2O_2$  снижалось после 1 ч контакта АМ с 10 и 30% ЭСД, оставаясь в 1,5 раза выше контроля, но ниже чем в клетках без кверцетина и контактировавших с ЭСД. Уровень ТБК-активных продуктов в клетках, обработанных кверцетином, был ниже, чем в пробах без кверцетина в случае 1 ч инкубации АМ с 30% ЭСД ( $p < 0,05$ ). Отмечен более низкий уровень карбонильных производных белков под влиянием кверцетина в этих же условиях эксперимента (2,80: 1,90–3,90 «без кверцетина»; 1,60: 1,45–1,80 нмоль/мг белка «с кверцетином»), с использованием 10% ЭСД (2,10: 1,80–3,15 нмоль/мг белка «без кверцетина»; 1,35: 1,15–1,60 нмоль/мг белка «с кверцетином»). При более продолжительной инкубации АМ с ЭСД положительный эффект кверцетина, направленный на предотвращение роста ТБК-активных продуктов ПОЛ и продуктов окисления белков, вообще отсутствовал. А в пробах, в которые предварительно вносили кверцетин при контакте клеток с 30% ЭСД, уровень карбонильных производных белков даже вырос (8,45: 6,90–8,80 нмоль/мг белка «без кверцетина»; 9,20: 8,90–9,60 нмоль/мг белка «с кверцетином»). Этот эффект сопровождался накоплением  $H_2O_2$  и падением активности антиоксидантных ферментов. На низкий уровень нитрит-ионов, сниженный под влиянием ЭСД в АМ, кверцетин не оказывал влияния.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

### **Основные научные результаты диссертации**

1. В результате контакта с экстрактом сигаретного дыма альвеолярные макрофаги крысы теряют жизнеспособность. Потеря жизнеспособности нарастает по мере увеличения концентрации экстракта сигаретного дыма в среде инкубации клеток и длительности контакта с ним. Эти изменения воспроизводятся смолами сигаретного дыма, которые сосредоточены в твердой его фазе, и пероксидом водорода в концентрации не менее  $10^{-3}$  моль/л [1, 3, 4, 13, 14].

2. Присутствие экстракта сигаретного дыма в среде инкубации альвеолярных макрофагов приводит к снижению фагоцитарной активности этих клеток, которое заключается в уменьшении количества фагоцитирующих макрофагов и количества поглощенных ими микроорганизмов. С увеличением продолжительности контакта с экстрактом сигаретного дыма снижение становится более выраженным. Пероксид водорода в концентрации  $10^{-3}$  моль/л, контактируя с альвеолярными макрофагами, также приводит к значительному снижению фагоцитарной активности [1, 3, 4, 13, 14].

3. Контакт альвеолярных макрофагов с экстрактом сигаретного дыма, по мере увеличения его концентрации и длительности контакта с ним, приводит к увеличению в клетках уровня пероксида водорода, продуктов свободнорадикального окисления липидов и белков, активации ядерного фактора NF-κB. При кратковременном (1 ч) контакте с экстрактом сигаретного дыма, по мере увеличения его концентрации, в альвеолярных макрофагах прогрессирующе снижается уровень нитрит-ионов. При более продолжительном контакте (20 ч) с экстрактом сигаретного дыма уровень нитрит-ионов в альвеолярных макрофагах растет, но не восстанавливается полностью [2, 3, 11, 12, 15–17].

4. Экстракт сигаретного дыма вызывает угнетение ферментативного звена антиоксидантной системы в альвеолярных макрофагах: снижается активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы. Падает уровень соединений, содержащих SH-группу. Эти изменения углубляются при более продолжительном контакте клеток с экстрактом сигаретного дыма и более высокой его концентрации. Продолжительная инкубация (20 ч) клеток, сама по себе, приводит к уменьшению концентрации в них соединений, содержащих SH-группу. Контакт с экстрактом сигаретного дыма еще больше усиливает его выраженность [2, 3, 11, 12, 15–17].

5. Влияние N-ацетилцистеина, куркумина, резвератрола, эпигаллокатехин галлата и кверцетина на интактные альвеолярные макрофаги крысы проявляется в их антиоксидантном действии: снижении концентрации пероксида водорода, нитрит-ионов, карбонильных производных белков (только для N-ацетилцистеина), повышении активности глутатионпероксидазы, каталазы (за исключением кверцетина), супероксиддисмутазы (за исключением N-ацетилцистеина и кверцетина), уровня небелковых SH-соединений. Одновременно увеличивается фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов (для N-ацетилцистеина, куркумина и эпигаллокатехин галлата). Прединкубация клеток с резвератролом и кверцетином, наоборот, угнетает эту функцию альвеолярных макрофагов [5, 7–10, 18].

6. Эпигаллокатехин галлат предотвращает угнетение фагоцитарной активности, вызванного кратковременным (до 1 ч) контактом клеток с 10%



экстрактом сигаретного дыма. Другие соединения (см. п. 5), использовавшиеся для предварительной инкубации с альвеолярными макрофагами, не предотвращают полностью снижение фагоцитарной активности, хотя куркумин и N-ацетилцистеин существенно повышают эффективность проявления этой функции такими альвеолярными макрофагами [5, 7–10, 18].

7. N-ацетилцистеин, куркумин, эпигаллокатехин галлат и кверцетин предотвращают нарастание в альвеолярных макрофагах пероксида водорода, вызванное 10% экстрактом сигаретного дыма, а куркумин – и 30% экстрактом. Эти же соединения и резвератрол эффективны в предотвращении накопления в клетках легких продуктов перекисного окисления липидов, а куркумин, резвератрол и кверцетин – и продуктов окисления белков. Этот эффект исчезает спустя 20 ч воздействия 30% экстракта сигаретного дыма на альвеолярные макрофаги. Все вышеуказанные антиоксиданты неэффективны в предотвращении снижения уровня нитрит-ионов в альвеолярных макрофагах, вызванного экстрактом сигаретного дыма [5, 7–10, 18].

8. N-ацетилцистеин, куркумин, резвератрол и эпигаллокатехин галлат эффективно предотвращают вызванное 10% экстрактом сигаретного дыма снижение в альвеолярных макрофагах уровня восстановленного глутатиона, активности супероксиддисмутазы и каталазы. При контакте клеток с 30% ЭСД такое влияние куркумина, резвератрола и эпигаллокатехин галлата неэффективно. Кверцетин не способен предотвращать вышеназванные изменения.

Компоненты антиоксидантной системы альвеолярных макрофагов, перенесшие количественные изменения в результате длительного (20 ч) контакта клеток с экстрактом сигаретного дыма, минимально подвержены корректирующему влиянию применявшимися антиоксидантами. В результате уровень небелковых SH-содержащих соединений, активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы оставались ниже контрольных значений, как в клетках, контактировавших с экстрактом сигаретного дыма, но не с антиоксидантами. Куркумин, резвератрол и кверцетин приводят к еще большему снижению активности глутатионпероксидазы, а в случае резвератрола и кверцетина – активности каталазы, чем в альвеолярных макрофагах, контактировавших с экстрактом сигаретного дыма без предварительной обработки антиоксидантами [5, 7–10, 18].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Результаты исследования раскрывают динамику нарушения метаболических процессов в клетке, связанную с концентрацией сигаретного дыма и длительностью его воздействия. Накопление большого количества радикальных соединений в альвеолярных макрофагах при контакте клеток с си-

гаретным дымом обусловлено усиленной генерацией активных форм кислорода и снижением их катаболизма. Это является основой окислительной деструкции клеточных белков и липидов. Уменьшение концентрации нитрит-ионов и фагоцитарной активности, активация транскрипционного фактора каппа В способствуют снижению неспецифической иммунной защиты и развитию воспалительной реакции в легких.

Полученные данные позволили обоснованно исследовать соединения, обладающие антиоксидантным действием, для целей коррекции, поскольку доказана взаимосвязь накопления в альвеолярных макрофагах активных форм кислорода со снижением их фагоцитарной активности. Проведена сравнительная оценка эффективности кверцетина, куркумина, резвератрола, эпигаллокатехин галлата и N-ацетилцистеина в предотвращении изменений метаболизма, жизнеспособности и фагоцитарной активности, которые возникают при контакте клеток с сигаретным дымом.

Продемонстрирована неспособность полифенольных антиоксидантов и N-ацетилцистеина в однократной добавке корректировать возникающие изменения при длительном контакте альвеолярных макрофагов с сигаретным дымом. При непродолжительном контакте клеток с сигаретным дымом доказана приоритетная значимость использования эпигаллокатехин галлата и N-ацетилцистеина. Результаты работы обосновывают необходимость постоянного восполнения фонда антиоксидантов в клетках легких, которое следует проводить с учетом интенсивности воздействия на них сигаретного дыма.

Полученные сведения рекомендуется учитывать в разработке и использовании антиоксидантной терапии легочных заболеваний у курящих людей.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

### Статьи в научных журналах

1. Девина, Е.А. Изменение жизнеспособности и фагоцитарной активности макрофагов легких после экспозиции с экстрактом сигаретного дыма / Е.А. Девина, А.Д. Таганович // Лаб. діагн. (Киев). – 2009. – № 4 (50). – С. 7–12.
2. Девина, Е.А. Влияние сигаретного дыма на компоненты оксидантно-антиоксидантной системы в альвеолярных макрофагах / Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, А.Д. Таганович // Лаб. діагн. (Киев). – 2010. – № 1 (51). – С. 10–14.
3. Девина, Е.А. Влияние экстракта сигаретного дыма на состояние альвеолярных макрофагов крыс / Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, А.Д. Таганович // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2010. – № 2. – С. 11–15.
4. Девина, Е.А. Особенности изменения функциональной активности альвеолярных макрофагов при контакте с сигаретным дымом / Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, А.Д. Таганович // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2010. – № 3. – С. 75–80.
5. Девина, Е.А. Влияние N-ацетилцистеина на функциональную активность альвеолярных макрофагов, контактировавших с экстрактом сигаретного дыма, и показатели метаболизма активных форм кислорода и азота / Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, А.Д. Таганович // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2010. – № 4. – С. 72–79.
6. Таганович, А.Д. Перспективы использования антиоксидантов для лечения хронической обструктивной болезни легких / А.Д. Таганович, Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, Н.Д. Таганович / Леч. дело. – 2010. – № 5 (15). – С. 50–56.
7. Таганович, А.Д. Эффективность куркумина в предотвращении функциональных и метаболических изменений альвеолярных макрофагов после контакта с сигаретным дымом / А.Д. Таганович, Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, Л.А.Фефилова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2011. – № 1. – С. 23–28.
8. Девина, Е.А. Сравнительная оценка антиоксидантного действия резвератрола и эпигаллокатехин галлата при окислительном стрессе, индуцированном сигаретным дымом в альвеолярных макрофагах / Е.А. Девина, А.Д. Таганович // Лаб. діагн. (Киев). – 2011. – № 1 (55). – С. 12–17.
9. Девина, Е.А. Дозозависимый эффект куркумина на состояние метаболизма альвеолярных макрофагов в условиях воздействия сигаретного дыма / Е.А. Девина // Рецензир. науч.-практ. ежегодник // ГУ Республиканская

нац. мед. библиотека. – Минск, 2011. – Вып. XV: Достижения медицинской науки Беларуси. – С. 107–108.

10. Кандилинская, О.Л. Лектины лекарственных растений дикорастущей флоры Беларуси: перспективы использования / О.Л. Кандилинская, Е.Р. Грищенко, Л.В. Обуховская, И.П. Мастибротская, О.М. Масловский, А.Д. Таганович, Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, Т.В. Шман, Н.А. Шуканова, В.В. Голубков // Вестник фонда фонд. исслед. – 2011. – № 2 (56). – С. 169–184.

#### **Статьи в сборниках научных трудов**

11. Принькова, Т.Ю. Состояние оксидантно/антиоксидантного равновесия в альвеолярных макрофагах, подвергнутых воздействию сигаретного дыма / Т. Ю. Принькова, Е. А. Девина, А. Д. Таганович // Труды молодых ученых 2009: сб. науч. работ / Белорусский гос. мед. ун-т; под общ. ред. проф. С.Л. Кабака. – Минск, 2009. – С. 129–132.

#### **Статьи и тезисы докладов в материалах конференций**

12. Kadushkin, A.H. Features of changes in oxidant/antioxidant of alveolar macrophages exposed to cigarette smoke / A.H. Kadushkin, E.A. Devina // Abstract book 3<sup>rd</sup> International Medical Congress for young doctors «MedEspera», Chisinau, Republic of Moldova, May 19–21, 2010. – С. 10–11.

13. Девина, Е.А. Влияние экстракта табачного дыма на функциональную активность изолированных альвеолярных макрофагов / Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, А.Д. Таганович / Достижения современной биологии, химии и медицины: материалы республиканской конференции, посвященной 100-летию со дня рождения В.А. Бандарина, БГМУ, 29 мая 2009 г., Минск. – С. 23–24.

14. Девина, Е.А. Функциональная активность и продукция оксида азота альвеолярными макрофагами в условиях воздействия сигаретного дыма / Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, А.Д. Таганович // Материалы Республиканской научно-практической конференции, посвященной 90-летию Министерства здравоохранения РБ, БГМУ, 19 июня 2009 г., Минск. – С. 335–337.

15. Принькова, Т.Ю. Влияние экстракта сигаретного дыма на активность ферментов антиоксидантной системы альвеолярных макрофагов / Т.Ю. Принькова, Е.А. Девина, А.Д. Таганович // Материалы Республиканской научно-практической конференции, посвященной 90-летию Министерства здравоохранения РБ, 19 июня 2009 г. Минск. – С. 499–500.

16. Кадушкин, А.Г. Изменение активности антиоксидантных ферментов в альвеолярных макрофагах под влиянием экстракта сигаретного дыма / А.Г. Кадушкин, Е.А. Девина // Тезисы докладов III Международного моло-

дежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения – 2009», Санкт-Петербург, 2–4 декабря 2009 г. – С. 22–23.

17. Девина, Е. А. Влияние экстракта сигаретного дыма на транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B в альвеолярных макрофагах крыс / Е.А. Девина, Т.Ю. Принькова, О.В. Петракова, Е.В. Соколовская, А.Д. Таганович // Патогенез социально значимых заболеваний человека: материалы конференции, БГМУ, 2010 г. / Белорусский гос. мед. ун-т / под общ. ред. проф. С.Л. Кабака. – Минск: БГМУ, 2010. – С. 3–6.

18. Девина, Е. А. Эффект куркумина и N-ацетил-L-цистеина на состояние метаболизма альвеолярных макрофагов в условиях воздействия сигаретного дыма / Е. А. Девина, А. Д. Таганович // Биоантиоксидант: тезисы докладов VIII Международной конференции, Москва, 4–6 октября 2010 г. – М.: РУДН, 2010. – С. 136–137.

## РЭЗІЮМЭ

Дзевіна Алена Анатольеўна

### Функцыянальна-метабалічная перабудова альвеолярных макрафагаў пад уздзеяннем цыгарэтнага дыму і яе карэкцыя

**Ключавыя словы:** альвеолярныя макрафагі (АМ), экстракт цыгарэтнага дыму (ЭЦД), антыаксіданты, хранічная абструктыўная хвароба лёгкіх.

**Аб'ект даследавання:** ізаляваныя альвеолярныя макрафагі пацукоў, культываныя ў пажыўным асяроддзі, узбагачаным цыгарэтным дымам.

**Прадмет даследавання:** паказчыкі фагацытарнай актыўнасці; жыццяздольнасць; паказчыкі, якія характарызуюць узровень актыўных форм кіслароду (АФК) і азоту, акіслення ліпідаў і бялкоў – канцэнтрацыя пераксіду вадароду, нітрыт-іонаў, ТБК-актыўных прадуктаў, карбанільных вытворных бялкоў; антыаксідантная абарона – актыўнасць супераксідысмутазы, каталазы, глутатіонпераксідазы, узровень небялковых SH-злучэнняў; паказчык працэсаў траскрыпцыі генаў празапаленчых медыятараў – канцэнтрацыя ядзернага фактару (NF-κB).

**Мэта даследавання:** вызначыць асаблівасці акісляльнага метабалізму, функцыянальнай актыўнасці і жыццяздольнасці АМ пры кантакце з цыгарэтным дымам і параўнальную эфектыўнасць антыаксідантаў па прадухіленні выяўленых змяненняў.

**Метады:** біяхімічныя, мікраскапія, імунаэлектрафарэз.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** на эксперыментальнай мадэлі вывучана ўздзеянне ЭЦД на функцыянальную актыўнасць і паказчыкі метабалізму АМ. Даказана ўзаемасувязь накаплення ў альвеолярных макрафагах АФК са зніжэннем іх фагацытарнай актыўнасці. Праведзена параўнальная ацэнка эфектыўнасці кверцетыну, куркуміну, рэзвератролу, эпігалакатэхін галлату (ЭГКГ) і N-ацэтылцыстэіну (N-АЦ) у прадухіленні змяненняў, якія ўзнікаюць пры кантакце клетак з ЭЦД. Прадэманстравана няздольнасць поліфенольных антыаксідантаў і N-ацэтылцыстэіну ў аднаразовым дабаўленні карыгіраваць змяненні, якія ўзнікаюць пры працяглым (20 ч) кантакце АМ з цыгарэтным дымам. Пры непрацяглым (1 ч) кантакце клетак з ЦД даказана прыярытэтная значнасць выкарыстання ЭГКГ і N-ацэтылцыстэіну. Вынікі работы абгрунтоўваюць неабходнасць пастаяннага папаўнення фонду антыаксідантаў у клетках лёгкіх, якое трэба праводзіць з улікам інтэнсіўнасці ўздзеяння на іх цыгарэтнага дыму.

**Рэкамедацыі па выкарастанні:** атрыманыя звесткі рэкамендуецца ўлічваць у тэрапіі і прафілактыцы лёгчых захворванняў у людзей, якія кураць.

**Вобласць ужывання:** біяхімія, пульманалогія, валеалогія.

## РЕЗЮМЕ

Девина Елена Анатольевна

### **Функционально-метаболическая перестройка альвеолярных макрофагов под влиянием сигаретного дыма и ее коррекция**

**Ключевые слова:** альвеолярные макрофаги (АМ), экстракт сигаретного дыма (ЭСД), антиоксиданты, хроническая обструктивная болезнь легких.

**Объект исследования:** изолированные альвеолярные макрофаги крыс, культивируемые в питательной среде, обогащенной сигаретным дымом.

**Предмет исследования:** показатели фагоцитарной активности; жизнеспособность; показатели, характеризующие уровень активных форм кислорода (АФК) и азота, окисления липидов и белков – концентрация пероксида водорода, нитрит-ионов, ТБК-активных продуктов окисления липидов, карбонильных производных белков; антиоксидантная защита – активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, уровень небелковых SH-соединений; показатель процессов транскрипции генов провоспалительных медиаторов – концентрация ядерного фактора (NF- $\kappa$ B).

**Цель исследования:** определить особенности окислительного метаболизма, функциональной активности и жизнеспособности АМ при контакте с сигаретным дымом и сравнительную эффективность антиоксидантов по предотвращению выявленных изменений.

**Методы:** биохимические, микроскопия, иммуноэлектрофорез.

**Полученные результаты и их новизна:** на экспериментальной модели изучено действие ЭСД на функциональную активность и показатели метаболизма АМ. Доказана взаимосвязь накопления в альвеолярных макрофагах АФК со снижением их фагоцитарной активности. Проведена сравнительная оценка эффективности кверцетина, куркумина, резвератрола, эпигаллокатехин галлата (ЭГКГ) и N-ацетилцистеина (N-АЦ) в предотвращении изменений, которые возникают при контакте клеток с ЭСД. Продемонстрирована неспособность полифенольных антиоксидантов и N-ацетилцистеина в однократной добавке корригировать возникающие изменения при длительном (20 ч) контакте АМ с сигаретным дымом. При непродолжительном (1 ч) контакте клеток с СД доказана приоритетная значимость использования ЭГКГ и N-ацетилцистеина. Результаты работы обосновывают необходимость постоянного восполнения фонда антиоксидантов в клетках легких, которое следует проводить с учетом интенсивности воздействия на них сигаретного дыма.

**Рекомендации по использованию:** полученные сведения рекомендуются учитывать в терапии и профилактике легочных заболеваний у курящих людей.

**Область применения:** биохимия, пульмонология, валеология.

## SUMMARY

**Devina Elena Anatolievna**

### **Functional and metabolic changes of alveolar macrophages under the influence of cigarette smoke and their correction**

**Keywords:** alveolar macrophages (AM), cigarette smoke extract (CSE), oxidant/antioxidant balance, correction, chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

**Object of research:** isolated rat alveolar macrophages cultured in medium enriched with cigarette smoke extract.

**Subject of research:** indicators of phagocytic activity; viability; the level of reactive oxygen and nitrogen species, products of lipid peroxidation and protein carbonyl derivatives; antioxidant protection – superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, the level of nonprotein SH-compounds; concentration and localization of nuclear factor (NF- $\kappa$ B) – regulator of transcription of proinflammatory mediators.

**Aim of research:** to determine the dynamics of oxidative metabolism changes, functional activity and viability of alveolar macrophages subjected to contact with and to evaluate the relative effectiveness of different antioxidants to prevent the revealed changes.

**Methods:** biochemical, light microscopic, immunoelectrophoresis.

**Obtained result and their novelty:** the action of cigarette smoke extract on the functional activity and metabolism of rat AM has been studied. The relationship of ROS accumulation in the AM with a reduction of their phagocytic activity has been proved. The effects of quercetin, curcumin, resveratrol, epigallocatechin gallate (EGCG) and N-acetylcysteine (N-AC) on determined metabolic and functional parameters in AM were carried out. An ability of these antioxidants to prevent the revealed changes was estimated. A comparative evaluation of those antioxidants occurs upon contact of cells with CSE. Polyphenol antioxidants and N-AC one-phase added to alveolar macrophages demonstrated the inability to prevent changes in AM occurring during prolonged contact (20 h) with cigarette smoke. Brief contact of the cells with cigarette smoke (1 h) demonstrated benefits of EGCG and N-AC application. The data obtained show the necessity of a permanent fund replenishment of antioxidants in lung cells, which should be undertaken with regard to intensity of exposure to cigarette smoke.

**Recommendations on usage:** obtained information should be take into consideration during treatment of patients with COPD and in smokers to minimize lung changes induced by cigarette smoke.



**Field of application:** pulmonology, biochemistry, valeology.

Подписано в печать 28.09.11. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Кюм Люкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,34. Тираж 60 экз. Заказ 634.

Издатель и полиграфическое исполнение:

учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.

ЛП № 02330/0150484 от 25.02.2009.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.