

Е.А. Девина, А.Д. Таганович

СОСТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА И ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР — κB В АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГАХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ СИГАРЕТНОГО ДЫМА

Белорусский государственный
медицинский университет, г. Минск

Оксиданты, в первую очередь активные формы кислорода (АФК), играют ключевую роль в молекулярных механизмах патогенеза различных заболеваний легких [20]. В понимании хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) основополагающим остается представление о воспалительном ответе на воздействие ингалируемых частиц и газов. Табачный дым является наиболее агрессивным этиологическим фактором ХОБЛ. Известно, что при вдыхании табачного дыма в легкие поступает 10^{14} – 10^{16} спинов на грамм смолы свободных радикалов. Одной из проблем современной медицины является установление взаимосвязи между кислородными радикалами и воспалительным процессом. Полагают что, в формировании воспалительного процесса в легких, активное участие принимают альвеолярные макрофаги [2]. В частности, эти клетки продуцируют повышенное количество АФК, способных инициировать процессы перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот с последующим образованием гидроперекисей липидов. Усиленная продукция супероксидного радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$), гидроксильного радикала (OH^{\cdot}) и пероксида водорода (H_2O_2) может непосредственно вносить вклад в повреждение легочной ткани или через регуляцию редокс-зависимых транскрипционных факторов и синтез провоспалительных цитокинов [14, 16]. Нарушение внутриклеточного баланса оксидантов может быть обусловлено не только их возросшим образованием, но и угнетением функционирования антиоксидантов при воздействии сигаретного дыма (СД). В литературе, не смотря на актуальность такого предположения, нет однозначного суждения об изменении антиоксидантного статуса как у курящих людей, как и при воздействии СД на различные типы клеток *in vitro*.

Нуклеарный фактор- κB (NF- κB) — это белок, который регулирует транскрипцию многих провоспалительных молекул, таких как фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкин- 1β (ИЛ- 1β), интерлейкин-6 (ИЛ-6), макрофагальный воспалительный протеин- 1β , циклооксигеназа-2, индуцибельная NO-синтаза, молекул клеточной адгезии (ICAM-1) [12]. Несмотря на накопленный к настоящему времени фактический материал о роли NF- κB в жизнедеятельности клетки, существуют значительные разногласия в оценке активации данного транскрипционного фактора в зависимости от природы индуцирующего сигнала, особенно АФК. Так, было обнаружено ингибирующее влияние H_2O_2 на активность NF- κB в нейтрофилах [23]. Напротив, имеются множественные доказательства того, что АФК активируют NF- κB [10]. Современные данные литературы, характеризующие эффект СД на NF- κB , также весьма противоречивы. Сообщают, что СД активировал [22], ингибировал [9] и не оказывал эффекта на активацию NF- κB в различных типах клеток [14].

Цель исследования: оценить показатели оксидантно-антиоксидантного состояния и концентрацию NF- κB в альвеолярных макрофагах (АМ) в условиях воздействия СД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

АМ получали из бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Лаважную жидкость центрифугировали. Из популяций клеток АМ выделяли путем адгезии к пластику в концентрации $2,0 \cdot 10^6$ на чашку Петри и инкубировали 120 мин при температуре 37°C в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO_2 . После инкубации клеток жидкую фазу удаляли, а к адгезированным макрофагам добавляли среду Игла, модифицированную Дульбекко (ДМЕМ), обогащенную СД (10% и 30%), инкубировали в течение 1 ч и 20 ч.

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 ДМЕМ с использованием автоматического вакуумного насоса. Стандарт ЭСД, соответствующий значению оптической плотности ($\text{OD } 1,0 \pm 0,1$) при длине волны 320 нм, рН 7,4 принимался за 100%. Концентрации ЭСД — 10 и 30% получали путем разведения, стерилизовали с применением бак-

териального фильтра (Millipore, Sigma), диаметр пор 0,22 мкм.

После инкубации АМ соскребали с поверхности чашек скрепером, и клеточную суспензию гомогенизировали. Для оценки состояния свободно-радикальных процессов, протекающих в клетках легких при контакте с СД, в АМ измеряли; концентрацию H_2O_2 (в качестве конечного и стабильного метаболита $O_2^{\cdot -}$); продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали по количеству образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразинов [13]. Состояние ферментативной антиоксидантной системы АМ оценивалось по уровню активности ферментов. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли непрямым спектрофотометрическим методом, основанным на использовании реакции супероксидзависимого окисления кверцетина; глутатионпероксидазы (ГПО) — по скорости окисления глутатиона (Г-SH) в присутствии гидроперекиси трет-бутила. Активность каталазы (Кат) измеряли методом комплексообразования с солями молибдена. Внутриклеточный уровень небелковых SH-соединений в АМ определяли спектрофотометрически с использованием реактива Элмана. Нуклеарный фактор-κВ оценивали по транслокации субъединицы p65 из

цитоплазмы в ядро. Субъединица p65 NF-κB была выявлена с помощью блот-анализа с использованием первичных крысиных антител (Stress gene KAS-TF110, США) и вторичных антител, меченых пероксидазой хрена (Rochland, США). Учет реакции проводили денситометрически, анализ изображений проводили с использованием программы Image I 1.34s. Отклонения определяемых показателей оценивали путем сравнения их значений с полученными при исследовании АМ, которые не контактировали с СД (контроль).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке состояния свободнорадикальных процессов в АМ при контакте с ЭСД было установлено, что инкубация АМ с 10% ЭСД в течение 1 ч вызывала увеличение H_2O_2 в клетках на 54,4%, и в 2,2 раза при 30% ЭСД, по отношению к контролю; суммарное (в среде инкубации и в клетках) содержание H_2O_2 возросло на 50% в течение 20 ч инкубации АМ с 10% ЭСД (табл.). Повышение концентрации ЭСД увели-

Таблица

Показатели свободнорадикального метаболизма в альвеолярных макрофагах, контактировавших с сигаретным дымом

Показатели	Условия инкубации — 1 ч			Условия инкубации — 20 ч		
	Контроль	10% ЭСД	30% ЭСД	Контроль	10% ЭСД	30% ЭСД
H_2O_2 , нмоль/ 10^6 клеток, n=6	4,48 3,60–4,74	6,821 6,44–7,20	9,641,2 7,80–10,20	4,80 4,46–5,42	7,201 6,26–7,46	8,601,2 8,28–9,64
ТБК-активные продукты, нмоль/ 10^6 клеток, n=6	0,95 0,80–1,10	1,15 0,90–1,20	1,801,2 1,50–1,90	1,10 1,10–1,20	1,801 1,60–2,20	2,751,2 2,60–2,90
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка, n=6	1,1 0,9–1,3	2,11 1,8–3,1	2,81,2 1,9–3,9	1,2 1,0–1,4	7,21 6,8–8,6	8,41 6,9–8,9
Соединения, содержащие SH-группу, нмоль/мг белка, n=6	12,20 11,50–16,40	10,201 9,80–10,70	8,901,2 8,70–9,00	10,60 10,00–10,90	6,301 5,95–6,55	5,801 5,25–6,25
СОД, мЕ/мг белка, n=10	8,80 8,30–9,30	8,05 6,90–8,80	7,201 6,20–7,40	9,00 8,80–9,70	3,401 3,00–4,55	3,101 2,40–3,80
Каталаза, мЕ/мг белка, n=10	108,0 104,0–110,4	77,71 68,8–84,2	55,11,2 53,0–67,2	109,0 93,0–118,0	42,21 38,0–44,8	39,51 37,5–41,1
ГПО, нмоль/мин/мг белка, n=10	64, 59,2–66,1	52,21 51,7–56,3	45,01,2 41,0–48,6	65,0 60,0–68,2	35,21 33,3–36,2	27,11,2 22,8–29,4

Примечание. Данные представлены как медиана и 50% интерквартильный размах — между 25-м и 75-м процентилями; 1 — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; 2 — $p < 0,05$ по сравнению с 10% экстрактом сигаретного дыма.

чивало содержание H₂O₂ на 79%, по сравнению с контролем. Содержание карбонильных производных белков повышалось в 2 раза в АМ, контактировавших с 10% ЭСД, и в 2,5 раза с 30% ЭСД, длительность инкубации увеличивала этот показатель в 7 раз в сравнении с контролем, независимо от концентрации ЭСД. Максимально высокий уровень ТБК-активных продуктов был отмечен при относительно продолжительной (20 ч) инкубации АМ с ЭСД в концентрации 30%. Уровень ТБК-активных продуктов был выше контрольного и при кратковременной (в течение 1 ч) инкубации АМ с 30% ЭСД. При использовании более низкой концентрации ЭСД уровень ТБК-активных продуктов не отличался от контрольного значения, хотя имела место некоторая тенденция к увеличению этого показателя. При длительном контакте АМ с ЭСД регистрировалось увеличение количества ТБК-активных продуктов — на 63,6% при концентрации ЭСД — 10%, и в 2,5 раза, соответственно 30% концентрации ЭСД.

Активность СОД через 1ч инкубации АМ с 10% ЭСД не отличалась от контроля. Повышение концентрации ЭСД до 30% вызывало снижение активности СОД на 18,1%. Активность Кат в АМ, в течение 1 ч снижалась в сравнении с медианой контроля на 30,1 и 50,8%, соответственно, возрастающей концентрации ЭСД. При инкубации клеток с ЭСД в течение 20 ч угнетение активности СОД и каталазы имело место вне зависимости от концентрации ЭСД; Кат, в среднем, на — 62,4%, СОД на — 65,4%, активность ГПО снижалась постепенно при инкубации АМ с 10% ЭСД в течение 1 ч на — 10,7% от контрольного уровня. ЭСД 30% концентрации снижал активность ГПО на — 27,5% от контрольных значений. Увеличение времени инкубации АМ с ЭСД сопровождалось выраженным угнетением активности ГПО в зависимости от концентрации ЭСД: снижение составило 45,6% при 10% ЭСД, и 58,1% при 30% ЭСД от контроля. Таким образом, при длительной инкубации особенность заключалась в том, что снижение активности ГПО было наибольшим при максимальной концентрации СД, а наиболее выраженное снижение активности Кат и СОД наблюдалось под влиянием минимальной (10%) концентрации ЭСД и в дальнейшем не имело развития.

Инкубация с ЭСД в течение 1 ч приводила к снижению содержания небелковых SH-соединений в АМ на 16,3% и на 28,8%, соответственно

концентрации ЭСД (10% и 30%). Длительный контакт клеток с ЭСД вызывал снижение небелковых SH-соединений на 40,5%, по сравнению с контролем, независимо от концентрации ЭСД.

Анализ содержания р65 в цитозольной и ядерной фракциях АМ показал, что через 18 ч инкубации с 10% ЭСД относительное количество р65 в ядре увеличилось на 69,7% по сравнению с контрольным уровнем (18,40:12,14 — 19,55 Ед/мкг) и составило 31,23:20,60 — 33,17 Ед/мкг ($p < 0,05$). При этом содержание общего белка под воздействием ЭСД снижалось в нуклеарной фракции до 600,4:540,5 — 680,5 мкг/мл (контроль 1000,8:860,8 — 1030,9 мкг/мл). В цитозольной фракции снижение концентрации белка также было существенным, до 780,9:570,9 — 820,2 мкг/мл против контроля 900,8:870,7 — 930,2 мкг/мл, в то время как белок р65 в цитозольной фракции макрофагов, подвергнутых контакту с ЭСД, не выявлялся.

Обнаруженное возрастание концентрации H₂O₂, ТБК-активных продуктов ПОЛ и рост уровня карбонильных производных белков, а также снижение активности антиоксидантных ферментов и количества небелковых SH-соединений свидетельствуют об изменении окислительного метаболизма в АМ как результате их совместной инкубации с ЭСД. В анализе причин этого явления, во-первых, следует обратиться к самому СД, газовая и твердая фаза которого содержат значительное количество радикалов [18]. В частности, в твердой фазе СД содержатся относительно стабильные долгоживущие радикалы, хинон (Q)/семихинон (QH·)/гидрохинон (QH₂), которые находятся в состоянии равновесия в вязком матриксе сигаретной смолы ($Q + QH_2 \leftrightarrow 2QH\cdot$). Хиноновые радикалы в водной среде способны превращать кислород (O₂) в O₂^{·-} ($QH\cdot + O_2 \rightarrow Q + O_2\cdot^- + H^+$), а O₂^{·-} может дисмутировать с образованием H₂O₂ ($2O_2\cdot^- + 2H_2 \rightarrow O_2 + H_2O_2$). В результате реакции одноэлектронного восстановления H₂O₂ может происходить генерация гидроксильного радикала ($H_2O_2 + e^- \leftrightarrow OH\cdot + OH^-$).

Другой механизм генерации свободных радикалов в СД основывается на окислении оксида азота (NO·) в диоксид азота (NO₂·), который реагирует с компонентом дыма, таким как изопрен, формируя углеродные радикалы (R·) [19].

Экзогенные АФК и реактивные частицы СД трудно проникают через мембрану, тем не менее, они способны инициировать протекание

свободно-радикальных реакций в клетках легких. Было показано, что стабильные компоненты СД инициируют продукцию $O_2^{\cdot-}$ через активацию мембрансвязанной НАДФН-оксидазы [8]. Установленный в настоящем исследовании рост концентрации H_2O_2 вместе с обнаруженным неуклонным нарастанием ТБК-активных продуктов, в зависимости от дозы и длительности инкубации с ЭСД, также свидетельствуют об увеличении образования АФК в альвеолярных макрофагах в результате контакта с СД. Полученные нами данные совпадают с результатами экспериментальных исследований, проведенных на других клеточных культурах и *in vivo*. Так, в конденсате выдыхаемого воздуха у курильщиков было повышено содержание H_2O_2 [15]. С другой стороны, в литературе можно встретить и такие результаты, согласно которым не было обнаружено значительных изменений уровня МДА под влиянием ЭСД. Об этом, в частности, судили по результатам экспозиции митохондрий, выделенных из мозга крысы, с СД в течение 1 ч [26]. По данным, полученным в других лабораториях, совместная инкубация фибробластов из легких человека с 10% ЭСД в течение 3 ч увеличивала содержание продуктов ПОЛ, о чем судили по увеличению уровня 4-гидроксиноненаля [3]. На изменение окислительного метаболизма в АМ при контакте с СД указывает установленное увеличение карбонильных производных аминокислот. Известно, что белки являются эффективными ловушками АФК, их окислительная модификация может рассматриваться как один из ранних и надежных маркеров окислительного повреждения в тканях [11]. Результаты настоящего исследования подтверждают данные литературы, согласно которым продукты окисления белков при окислительных повреждениях в тканях появляются раньше продуктов ПОЛ [6].

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

Возможной причиной повышения концентрации H_2O_2 в АМ под влиянием СД, наряду с увеличением образования, является снижение

активности Кат и ГПО. Кат катализирует реакцию восстановления H_2O_2 до воды в клетках, ГПО, используя восстановленную форму $\Gamma-SH$, в качестве субстрата, эффективно расщепляет не только H_2O_2 , но и органические гидроперекисные соединения. Интересно, что активность ключевого фермента, СОД катализирующего реакцию дисмутации $O_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 , также снижалась при контакте АМ с ЭСД. Таким образом, подъем уровня H_2O_2 в этих клетках под влиянием ЭСД протекает на фоне угнетения работы ферментативного звена метаболизма H_2O_2 .

Известно, что уровень активности внутриклеточных ферментативных антиоксидантов генетически детерминирован, при этом избыточное накопление в клетках $O_2^{\cdot-}$ или H_2O_2 сопровождается депрессией участков генома, ответственных за синтез и, следовательно, активность внутриклеточных антиоксидантных ферментов.

Снижение активности изучаемых ферментов может быть связано и с прямым действием АФК: окислительной модификацией аминокислотных остатков, изменением валентности и нарушением координационной геометрии металлов в области активного центра [24, 7]. Так, инкубация очищенной эритроцитарной $Cu, Zn-SOD$ с 5 мМ H_2O_2 в течение 30 мин сопровождалась окислением гистидина-118 с образованием оксигистидина в активном центре [25]. Установлено, что ключевую роль в катализе Se-содержащей ГПО играет селеноцистеин. В присутствии $O_2^{\cdot-}$ образуется радикал Se, затем перокси-радикал $SeO_2^{\cdot-}$, который превращается в SeO_2H , что вызывает торможение каталитической активности ГПО [5]. Значит, регистрируемое нами увеличение карбонильных производных в АМ при контакте с СД является одним из проявлений окислительной модификации аминокислотных остатков белковых молекул и может быть прямо сопряжено со снижением активности этих ферментов.

Небелковые SH-соединения, среди которых преобладает глутатион, и участвует посредством работы ГПО в расщеплении H_2O_2 и органических гидроперекисей, является основным внутри- и внеклеточным антиоксидантом, вовлеченным в защиту клетки от свободных радикалов, экзо- и эндогенных токсических веществ. Известно, что активность и эффективность протективного действия ГПО определяется внутриклеточной концентрацией $\Gamma-SH$ [1]. Можно предположить, что уменьшение количества восстановленного

Г-SH в АМ после контакта с СД способствует наблюдаемому в наших экспериментах снижению активности ГПО и увеличению количества H_2O_2 и ТБК-активных продуктов ПОЛ. Дело в том, что восстанавливая H_2O_2 и гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот, этот фермент предупреждает накопление вторичных продуктов пероксидации [1]. Г-SH, поддерживая тиол-дисульфидное равновесие в клетке, обеспечивает модулирование конформационного состояния белковых молекул и регулирует активность многих ферментов.

Обнаруженный нами дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в АМ (увеличение концентрации H_2O_2 , ТБК-активных продуктов, снижение уровня небелковых SH-соединений, активности Кат, ГПО и СОД) при контакте клеток с СД способен быть причиной продемонстрированного в наших экспериментах увеличения содержания субъединицы р65 в ядре, то есть, активации NF- κ B. Полагают, что при изменении редокс-статуса клетки, вызванного повышением ПОЛ, истощением восстановленного Г-SH и повышением уровня окисленного Г-SH происходит фосфорилирование, деградация I κ B и активация NF- κ B [21]. Как известно, NF- κ B находится в цитоплазме в неактивном состоянии в комплексе с ингибиторным белком I κ B. Активируется NF- κ B многими стимулами, включая цитокины, оксиданты, вирусы и антигены, которые увеличивают воспалительный ответ в тканях. Сигнальное событие (непосредственно АФК и гидроперекиси липидов, либо эффекторные молекулы, участвующие в сигнальных путях) приводит к транслокации белковых субъединиц транскрипционного фактора в ядро, где он связывается со специфическими последовательностями в промоторной зоне контролируемых генов [4]. Действительно, было показано, что H_2O_2 приводил к повышению ядерной транслокации NF- κ B в лимфоцитах и моноцитах. Это сопровождалось образованием мРНК, кодирующей ИЛ-8 и воспалительный белок макрофагов 1 α [27].

Возникает вопрос, с чем связан низкий уровень данного транскрипционного фактора (субъединицы р65) в цитоплазме клеток при длительном воздействии СД? Высвобожденная из комплекса субъединица р65, как известно, вызывает индукцию транскрипции гена, кодирующего I κ B белок. Это способствует восстановлению исходного уровня ингибитора, который может

связаться с NF- κ B и вернуть его в неактивное состояние [17].

Результаты исследования позволяют предполагать доминирующую роль АФК в активации транскрипционного фактора- κ B в АМ, который играет важную роль в развитии воспалительного процесса в легочной ткани, вызванного воздействием СД.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие СД вызывает изменение интенсивности окислительного метаболизма в АМ, которое заключается в увеличении продукции АФК на фоне снижения активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты. В результате увеличивается интенсивность окислительной модификации белковых молекул и процессов ПОЛ. Выявленные изменения метаболизма в АМ зависят от концентрации ЭСД и длительности его воздействия на клетки легких.

2. При длительном (18 ч) воздействии ЭСД на АМ в ядрах клеток увеличивается количество дискретной субъединицы р65 транскрипционного фактора- κ B.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулинский В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесничко // Усп. совр. биол. — 1990. — Т. 110, № 1. — С. 20–33.
2. Aoshiba K. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages / K. Aoshiba, J. Tamaoki, A. Nagai // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2001. — Vol. 281. — P. L1392–L1401.
3. Baglole C.J. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema / C.J. Baglole [et al] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2006. — Vol. 291, № 1. — P. L19–L29.
4. Barnes P.J. Nuclear factor- κ B — a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases / P.J. Barnes, M. Karin // *N. Engl. J. Med.* — 1997. — Vol. 336. — P. 1066–1071.
5. Blum J. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical / J. Blum, I. Fridovich // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1985. — Vol. 240, № 2. — P. 500–508.
6. Davies M.J., Fu S., Wang H. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease // *Free Rad. Biol. Med.* — 1999. — Vol. 27, № 11/12. — P. 1151–1163.
7. Dreyfus J.C. Posttranslational modifications of enzymes / J.C. Dreyfus, A. Kahn, F. Schapira // *Curr. Top. Cell. Regul.* — 1978. — Vol. 14. — P. 243–297.
8. Edgar A. Stable Compounds of Cigarette Smoke Induce Endothelial Superoxide Anion Production via NADPH Oxidase Activation / A. Edgar [et al] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2004. — Vol. 24. — P. 1031–1036.
9. Favatier F. Tobacco-smoke-inducibile human haem oxygenase-1 gene expression: role of distinct transcription factors and reactive oxygen intermediates / F. Favatier, B. S. Polla // *Biochem. J.* — 2001. — Vol. 353. — P. 475–482.

10. Gloire G. *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later* / G. Gloire, S. Legrand-Poels, J. Piette // *Biochem. Pharmacol.* — 2006. — Vol. 72. — P. 1493–1505.
11. Goto S. *Implications of protein degradation in aging* / S. Goto [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2001. — Vol. 928. — P. 54–64.
12. Hoffmann A. *Circuitry of nuclear factor kappaB signaling* / A. Hoffmann, D. Baltimore // *Immunol. Rev.* — 2006. — Vol. 210. — P. 171–186.
13. Levine R.L., Garland D., Oliver C. *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins* // *Methods Enzymol.* — 1990. — Vol. 186. — P. 464–478.
14. Moodie F.M. *Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells* / F.M. Moodie [et al.] // *FASEB J.* — 2004. — Vol. 18. — P. 1897–1899.
15. Nowak D. *Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers* / D. Nowak [et al.] // *Eur. Respir. J.* — 1996. — Vol. 9. — P. 652–657.
16. Osamitsu Yagi. *Activation of nuclear factor-kappaB in airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease* // *Respiration.* — 2006. — Vol. 73. — P. 610–616.
17. Perkins N.D. *The Rel/NF-kappaB family: friend and foe* / N.D. Perkins // *Trends Biochem. Sci.* — 2000. — Vol. 25, № 9. — P. 434–440.
18. Pryor W.A. *Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar* / W.A. Pryor, D.G. Prier, D.F. Church // *Environ. Health Perspect.* — 1983. — Vol. 47. — P. 345–355.
19. Pryor W.A. *Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyhydrate, and peroxyhydrate* / W.A. Pryor, K. Stone // *Ann. NY Acad. Sci.* — 1993. — Vol. 686. — P. 12–27.
20. Rahman I. *Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD* / I. Rahman, I.M. Adcock // *Eur. Respir. J.* — 2006. — Vol. 28. — P. 219–242.
21. Rahman I. *Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches* / I. Rahman, W. MacNee // *Free Radic. Biol. Med.* — 2000. — Vol. 28. — P. 1405–1420.
22. Shishodia S. *Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-kappaB activation through inhibition of Ikappa B alpha kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1* / S. Shishodia [et al.] // *Carcinogenesis.* — 2003. — Vol. 24. — P. 1269–1279.
23. Strassheim D. *Modulation of bone marrow-derived neutrophil signaling by H2O2: disparate effects on kinases, NF-kappaB, and cytokine expression* / D. Strassheim [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2004. — Vol. 286. — P. 683–692.
24. Terada L.S. *Inactivation of xanthine oxidase by hydrogen peroxide involves site-directed hydroxyl radical formation* / L.S. Terada [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* 1991. — Vol. 10, № 1. — P. 61–68.
25. Uchida K. *Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H2O2* / K. Uchida, S. Kawakishi. — *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269, № 4. — P. 2405–2410.
26. Yang Y.M. *Injury of mouse brain mitochondria induced by cigarette smoke extract and effect of vitamin C on it in vitro.* / Y.M. Yang, G.T. Liu // *Biomedical and environmental sciences.* — 2003. — Vol. 16. — P. 256–266.
27. Zeng Z. *S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappaB in human T cells* / Z. Zeng, Y. Rong, B.H.S. Lau // *Free Radic. Biol. Med.* — 1997. — Vol. 23, № 2. — P. 345–350.

СТАН ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ І ТРАНСКРИПЦІЙНИЙ ФАКТОР- κ B В АЛЬВЕОЛЯРНИХ МАКРОФАГАХ ЗА УМОВ ДІЇ ЦИГАРКОВОГО ДИМУ

Е. А. Девина, А. Д. Таганович

Вивчено стан вільнорадикального метаболізму і транскрипційний фактор- κ B в альвеолярних макрофагах (АМ) під впливом цигаркового диму *in vitro*. АМ виділяли з бронхо-альвеолярної лаважної рідини шурів. Виявлене значне збільшення концентрації перекису водня і рівня ТБК-активних продуктів ПОЛ та карбонільних похідних білків в АМ, які знаходились в контакт з екстрактом цигаркового диму (ЕЦД) протягом 1 і 20 год. Ці зміни супроводжувались пригніченням активності супероксиддисмутази, каталази і глутатіонпероксидази, зниженням рівня небілкових SH-сполук і підвищенням вмісту субодиниці p65 в ядерній фракції АМ. Виявлений дисбаланс залежав від концентрації ЕЦД і тривалості його інкубації з клітинами.

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

E.A. Devina, A.D. Tahanovich

The condition of free radical metabolism and nuclear factor- κ B in alveolar macrophages (AMs) under the influence of cigarette smoke was studied *in vitro*. AMs were isolated from bronchoalveolar lavage fluid of rats. The concentration of H₂O₂, the level of thiobarbituric acid reactive substances (which reflects lipid peroxidation), and the levels of protein carbonyl products produced by AMs were revealed to increase significantly after they were incubated for 1 and 20 h in medium supplemented with cigarette smoke extract (CSE). These changes were followed by suppressed activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and a decrease in the level non-protein SH-components. The content of p65 protein in the nuclear fraction of AMs increased under the influence of cigarette smoke. The revealed imbalance depends on CSE and duration of cell incubation with CSE.

УДК 616.633.1:616.611-002-07-053.2

С.П. Фоміна, І.В. Багдасарова,
Л.Я. Мигаль, Л.В. Король

ЕНЗИМОЛОГІЧНІ КРИТЕРІЇ У ПРОГНОЗУВАННІ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ З НЕФРОТИЧНИМ СИНДРОМОМ

ДУ "Інститут нефрології НАМН України", м. Київ

Найбільш складними щодо лікування у структурі захворювань органів сечової системи залишаються гломерулопатії, що клінічно проявляються нефротичним синдромом (НС). Як відомо, НС при первинному гломерулонофриті (ГН) у дітей —