

Сочетанное влияние дефицита кислорода и высокой температуры на показатели метаболизма альвеолярных макрофагов

Нами была исследована активность ферментов гликолиза (лактатдегидрогеназа), цикла Кребса (сукцинатдегидрогеназа) и пентозофосфатного пути (глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназа) в альвеолярных макрофагах в условиях сочетанного воздействия недостатка кислорода и высокой температуры, факторов играющих значительную роль в патогенезе заболеваний легких. Показано, что снижение концентрации кислорода приводит к понижению активности СДГ и одновременному повышению активности ЛДГ и ГЛ-6Ф-ДГ, причем при содержании кислорода менее 10% данные изменения активности становятся более интенсивными. Выявлено, что повышение температуры лишь обостряет ситуацию, усиливая вызванные гипоксией изменения.

Ключевые слова: ЛДГ, СДГ, Гл-6Ф-ДГ, альвеолярные макрофаги, дефицит кислорода, высокая температура.

E. M. Lobanova, A. D. Tahanovich

The combined effect of exposure to oxygen lack and high temperature on methabolism in alveolar macrophages

The oxygen deficiency and high temperature are the most common symptoms of the lung disorders. We studied the activity of lactatedehydrogenase (LDH), succinatdehydrogenase (SDH) and glucose-6phosphate-dehydrogenase (G-6P-DH) of alveolar macrophages (AM) in this conditions. Our data shows that hypoxia increased LDH and G-6P-DH activity of AM, but decreased SDH activity and these effects were more expressive if O₂ level was less than 10%. The high temperature appeared to changes which had been induced by exposure of AM to the lack of oxygen.

Key words: LDH, SDH, G-6P-DH, alveolar macrophages, hypoxia, high temperature

Кислород играет ключевую роль в энергообеспечении клеток. Снижение концентрации O₂ в крови либо нарушение его доставки к тканям неизбежно приводит к дефициту кислорода в клетках. Поэтому его дефицит, то есть гипоксия, является важным фактором нарушения функционирования и повреждения клеток и органов. В клетках системы органов дыхания обнаружена высокая скорость окислительного метаболизма [5], поэтому гипоксия оказывает выраженное действие на функционирование этой системы и является патогенетическим звеном большинства легочных заболеваний.

Почти всегда гипоксическому состоянию при заболеваниях органов дыхания сопутствует повышение температуры тела.

Логично предположить, что в условиях гипоксии и гипертермии в легочной ткани больше других страдают те клетки, в которых развиты аэробные процессы, активно функционируют ферменты цикла Кребса и окислительного фосфорилирования. К таким клеткам, в частности, относятся альвеолярные макрофаги (АМ), расположенные на богатой кислородом поверхности альвеол [1]. Активное участие АМ в остром и хроническом воспалении, происхождении гипертермии [2,3,7,8,9] позволяет предположить, что изменения функциональной и метаболической активности этих клеток, происходящие в условиях низкого содержания альвеолярного кислорода и повышенной температуры, будут оказывать влияние на течение и исход заболевания.

Целью данной работы была оценка влияния сочетанного действия высокой температуры и низкой концентрации кислорода в окружающей среде на метаболизм АМ. Для этого в этих клетках исследовали активность следующих ферментов: лактатдегидрогеназы (ЛДГ) — показателя интенсивности анаэробного гликолиза, сукцинатдегидрогеназы (СДГ) — показателя аэробного окисления ацетил-КоА в цикле Кребса и ключевого фермента пентозофосфатного пути окисления глюкозы — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГЛ-6-ФД).

Материалы и методы

Эксперимент был проведен на 16 беспородных крысах – самцах массой 180 — 200 г., находящихся на стандартном рационе вивария БГМУ. Альвеолярные макрофаги получали методом стандартного бронхо-альвеолярного лаважа. Клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл питательной среды DME (Sigma, США) с добавлением в нее антибиотиков (пенициллин, гентамицин) и L-глутамина.

АМ выделяли из смеси альвеолярных клеток путем прилипания их к поверхности пластиковых чашек Петри. Для этого клеточную суспензию высевали на пластиковые чашки Петри (Falcon, ФРГ) в конечной концентрации $2.0 \cdot 10^6$ макрофагов на чашку (количество клеток подсчитывали в камере Горяева) и инкубировали 2 часа в условиях нормальной (21% O₂) и сниженной концентрации кислорода (1.-10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂; 2.- 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) в интервале температур 37 °С — 42 °С.

По истечении данного времени инкубационную среду удаляли и к прилипшим клеткам добавляли 0.5 мл изотонического раствора NaCl. АМ соскребали с поверхности чашек Петри скрепером (Costar, США), после чего клеточную суспензию разрушали методом гомогенизации вручную. Активность ЛДГ и СДГ определяли методами, основанными на измерении скорости окисления НАДН•Н⁺ и восстановления феррицианида калия (III), соответственно [6]. Для определения активности ГЛ-6Ф-ДГ использовался метод, основанный на измерении скорости окисления НАДФН•Н⁺ [6]. Активность ЛДГ выражали в нмоль НАДН•Н⁺/мин•мг белка, СДГ — нмоль сукцината/мин•мг белка, ГЛ-6Ф-ДГ — нмоль НАДФН•Н⁺/мин•мг белка.

Все эксперименты были проведены шестикратно. Полученные данные обработаны методами вариационной статистики, оценку достоверности разницы измеряемых показателей проводили с помощью критерия t (Стьюдента) при $p < 0.05$, наличие связи между признаками определяли с использованием метода корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение

Снижение объемной доли кислорода в инкубационной газовой смеси до 10% приводило к снижению активности СДГ на 10.1% и повышению активности ЛДГ и ГЛ-6Ф-ДГ на 5.9% и 15.5%, соответственно. Однако только в случае ГЛ-6Ф-ДГ изменения были достоверны по отношению к контролю (таблица 1). Дальнейшее уменьшения концентрации кислорода в газовой смеси (до 5%) приводили к еще более выраженному изменению активности ферментов. На 27,8% снижалась активность СДГ, в то время как активность ЛДГ и ГЛ-6Ф-ДГ увеличивалась на 56.7% и 74.9%, соответственно. Изменения были статистически достоверны как по отношению к показателям активности ферментов при нормальной концентрации кислорода в окружающей среде, так и к их значениям в условиях недостатка O₂ (10%). Результаты корреляционного анализа выявили наличие сильных обратных корреляционных связей между снижением содержания кислорода в системе и активностью ЛДГ и ГЛ-

6Ф-ДГ, а также сильной прямой корреляционной связи между концентрацией кислорода и активностью СДГ. Проведенная математическая обработка результатов привела к составлению уравнений регрессии, которые дают возможность судить о приблизительных количественных изменениях активности ферментов по мере уменьшения концентрации кислорода в окружающей клетки среде.

Таблица 1

Влияние дефицита кислорода в среде инкубации на активность глюкоза-6фосфат-дегидрогеназы, лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы

| Объемная доля O ₂ в смеси | ЛДГ | СДГ | ГЛ-6Ф-ДГ |
|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 21% O ₂ | 106.8±0.61 | 7.15±0.04 | 15.5±0.26 |
| 10% O ₂ | 113.1±3.32 | 6.43±0.13 | 17.9±0.23* |
| 5% O ₂ | 167.3±1.58 ^(**) | 5.16±0.03 ^(**) | 27.11±0.96 ^(**) |
| r | -0.80 | 0.93 | -0.86 |
| R _{xy} | -3.25 | 0.11 | -0.64 |
| Уравнение регрессии | Y=106.8-3.25(X-21) | Y=7.15+0.11(X-21) | Y=15.5-0.64(X-21) |

Все данные представлены в виде M±m. *- изменения достоверны по отношению к показателям активности при нормальном снабжении кислородом, ** - изменения достоверны по отношению к показателям активности при содержании кислорода в окружающей атмосфере 10%

Следующим этапом нашей работы была оценка влияния температуры окружающей среды на активность ферментов АМ, инкубированных при нормальном снабжении кислородом. Как видно из табл. 2 повышение температуры инкубации клеток с 37 °С до 42 °С вызывало лишь тенденцию к повышению активности ЛДГ. Одновременно с этим активность СДГ неуклонно падала. Самой низкой (-23%) она была, если клетки инкубировались при температуре 42 °С. Причем, изменения активности данного фермента были статистически достоверны не только по сравнению с его активностью при 37 °С, но и по сравнению с активностью при каждой предыдущей температуре, отличающейся от данной на 1 °С. Активность же ГЛ-6Ф-ДГ, вначале нечувствительная к подъему температуры инкубации, впоследствии, при температуре 41 — 42 °С, существенно увеличивалась. При 42 °С она была на 19% выше исходной (37 °С).

При анализе корреляционной зависимости нами была обнаружена сильная обратная взаимосвязь между активностью СДГ и повышением температуры (r=-0.98), а также сильная прямая связь между повышением температуры инкубации и активностью ЛДГ и ГЛ-6Ф-ДГ (0.95 и 0.90, соответственно).

Влияние повышенной температуры на активность изучаемых ферментов, в целом, сохранялось и при умеренно сниженной концентрации O₂ в атмосфере инкубации АМ (10% O₂). Сочетание же высокой температуры инкубации и выраженного снижения концентрации кислорода в инкубационной газовой смеси (до 5%) приводило к качественным сдвигам (табл. 2). Хотя уменьшение активности СДГ оставалось, приблизительно, на том же уровне (-17%), резко возрастало активирующее действие перегревания на ГЛ-6Ф-ДГ, активность которой возрастала на 65,7% при повышении температуры с 37 до 42 °С. А вот стимулирующая способность повышения температуры на активность ЛДГ исчезала.

С другой стороны, влияние снижения концентрации O₂ в атмосфере инкубации АМ на фоне одной и той же повышенной температуры (42 °С) не только было приблизительно однотипным тому, которое имело место при 37 °С, но и значительно более выраженным в случае ГЛ-6Ф-ДГ (рис. 1).

Таблица 2

Влияние температуры инкубации АМ на активность ферментов, катализирующих окислительное превращение глюкозы в этих клетках (глюкоза-6фосфат-дегидрогеназы, лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы)

| Температура, °С | | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 |
|-----------------|--------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ЛДГ | 21% O ₂ | 106.8±0.61 | 107.4±1.36 | 109.5±1.24 | 108.9±1.03 | 110.4±6.08 | 112.3±3.90 |
| | 10% O ₂ | 113.1±3.32 | 114.2±5.83 | 115.1±0.87* | 116.3±1.94* | 115.8±4.17 | 116.7±2.74* |
| | 5% O ₂ | 167.3±1.58* | 166.8±1.44* | 165.6±1.87* | 158.3±8.55* | 160.7±5.60* | 165.8±0.93* |
| СДГ | 21% O ₂ | 7.15±0.04 | 6.57±0.04* | 6.44±0.07* | 6.10±0.02* | 5.91±0.12* | 5.51±0.01* |
| | 10% O ₂ | 6.43±0.13* | 6.13±0.04* | 5.90±0.04*(**) | 5.69±0.02*(**) | 5.41±0.03*(**) | 5.20±0.03*(**) |
| | 5% O ₂ | 5.17±0.03* | 4.87±0.06*(**) | 4.77±0.05*(**) | 4.73±0.08*(**) | 4.39±0.09*(**) | 4.31±0.08*(**) |
| ГЛ-6Ф-ДГ | 21% O ₂ | 15.5±0.26 | 15.7±0.27 | 15.5±0.32 | 16.2±0.90 | 17.2±0.33* | 18.5±0.46* |
| | 10% O ₂ | 17.9±0.23* | 19.5±0.21*(**) | 20.8±0.26*(**) | 24.7±1.03*(**) | 28.3±1.17*(**) | 31.3±0.24*(**) |
| | 5% O ₂ | 27.1±0.96* | 27.6±0.65* | 30.2±0.87* | 34.5±1.64*(**) | 38.9±0.93*(**) | 44.9±1.08*(**) |

Все данные представлены в виде M±m. * — изменения достоверны по отношению к показателям, измеренным при 21% O₂ и температуре 37 °С. ** — изменения достоверны по отношению к показателям, измеренным при соответствующем недостатке кислорода и температуре 37 °С

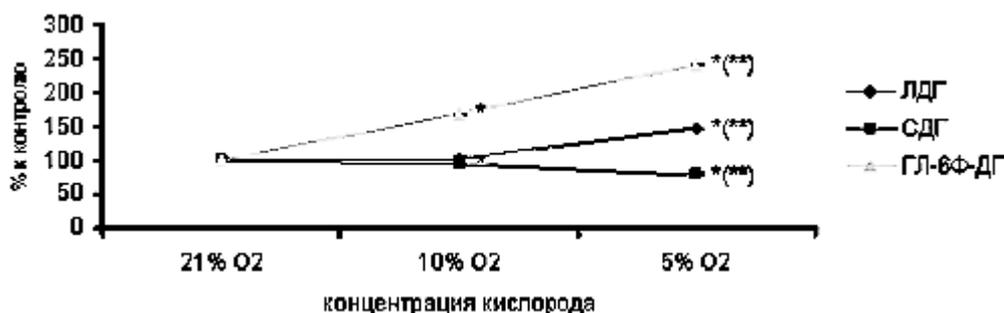


Рис. 1. Влияние дефицита кислорода в среде инкубации на активность ферментов гликолиза, цикла Кребса и пентозофосфатного цикла при температуре 42 °С

*- изменения достоверны по отношению к показателям активности при нормальном снабжении кислородом, **- изменения достоверны по отношению к показателям активности при содержании кислорода 10%. Изменения активности ферментов выражены в % по отношению к контролю. За контроль (100%) принята активность ферментов при 42 °С и нормальном снабжении кислородом.

Из этих данных становится очевидным, что при воздействии на АМ одновременно низкой концентрации кислорода и высокой температуры инкубации определяющее значение в перестройке метаболизма клеток принадлежит недостаточному снабжению кислородом. Причем, если снижение концентрации кислорода в окружающей среде до 10% приводит лишь к тенденции в изменении активности изучаемых ферментов АМ, при дальнейшем снижении концентрации кислорода происходит выраженное изменение в их активности.

Возможный механизм обнаруженного влияния концентрации кислорода может быть связан с гипоксия-индуцибельным фактором 1 (ГИФ-1). ГИФ-1 активирует

транскрипцию генов, продуктами которых является ЛДГ и белки-транспортеры глюкозы [10,14,15]. Известно, что в условиях дефицита O₂ синтез данного фактора в клетках растет [14]. Изменения во внутриклеточной концентрации ГИФ-1 фиксируются уже через 1 час с момента начала инкубации клеток в условиях дефицита O₂ [16]. В результате в клетке повышается активность ЛДГ и концентрация глюкозы (субстрата пентозофосфатного пути). Нарастание глюкозы в клетках способно привести к активации ГЛ-6Ф-ДГ.

Снижение активности СДГ в условиях недостатка O₂ в клетках, по всей вероятности, подчиняется иному механизму. Дело в том, что в этих условиях в клетках активируется фумаратредуктазная реакция, которая является обратной той, которую катализирует сукцинатдегидрогеназа в составе II комплекса системы тканевого дыхания [11]. В ходе этой реакции активно нарабатываются свободные радикалы кислорода (СРК). СРК способны непосредственно инактивировать СДГ [12]. Поэтому увеличение их образования в условиях нехватки кислорода неизбежно будет приводить к снижению активности данного фермента.

Негативный вклад высокой температуры в перестройку метаболизма АМ, вызванную дефицитом кислорода, заключается в усугублении возникающих изменений. Вероятно, данный эффект связан не только с непосредственным влиянием температуры на белки-ферменты, но и с общей реакцией клеток на перегревание, которая включает нарушение структуры мембран, изменение состава окружающей среды и т. д. Повышение активности ГЛ-6Ф-ДГ с ростом температуры, например, по-видимому, имеет в своей основе тот же механизм, что и при гипоксии, так как повышение температуры приводит к увеличению доступа глюкозы в клетку [13].

Повышение активности ЛДГ при недостаточном функционировании СДГ, с большой долей вероятности, представляет собой компенсаторный механизм, благодаря которому клетки пытаются возместить уменьшение количества образующейся энергии, возникающее вследствие угнетения работы цикла трикарбоновых кислот. Ранее нами было показано, что в условиях низкого содержания O₂ в окружающей среде происходит подавление фагоцитарной способности АМ [4]. Оно проявляется уже при температуре инкубации 37 °С. Рост температуры усугубляет наметившуюся тенденцию. На основании результатов, полученных в данной работе, можно заключить, что одним из факторов подавления фагоцитарной активности является энергодефицит, вызванный торможением работы цикла Кребса. Об этом свидетельствует обнаруженная нами сильная прямая корреляционная связь между активностью СДГ в АМ и способностью этих клеток к фагоцитозу. Причем происходящее повышение интенсивности процессов анаэробного гликолиза (в пользу этого свидетельствует обнаруженное увеличение активности ЛДГ) не компенсирует недостаток энергии и не приводит к восстановлению функциональной способности клеток (табл. 3).

Таблица 3

Влияние концентрации кислорода в окружающей среде на активность СДГ в АМ и способность этих клеток к фагоцитозу

| Объемная доля O ₂ в смеси | СДП | ФП (фагоцитарный показатель) |
|--------------------------------------|---|------------------------------|
| 21% O ₂ | 7.15±0.04 | 35±0.44 |
| 10% O ₂ | 6.43±0.13 | 26±3.33* |
| 5% O ₂ | 5.16±0.03 ^{***} | 24±2.44* |
| | r = 0.87, уравнение регрессии y = 0.127x - 3.4151 | |

Все данные представлены в виде M±m. *- изменения достоверны по отношению к показателям активности при нормальном снабжении кислородом, ** - изменения достоверны по отношению к показателям активности при содержании кислорода 10%

За ФП принимался процент фагоцитирующих клеток из общего числа макрофагов

Таким образом, дефицит кислорода в АМ приводит к характерным изменениям их внутриклеточного метаболизма. Предсказуемо падает активность ферментов, катализирующих аэробные процессы, и растет — ферментов, катализирующих анаэробные. Данные изменения приводят к нарушению энергопродукции клеток. Анаэробные процессы не способны компенсировать энергетические потребности АМ. Свидетельством или следствием этого, вероятно, является прогрессирующее (по мере снижения концентрации O₂) уменьшение фагоцитарной активности клеток. Повышенная температура в таких условиях (>37 °C), усугубляет изменения, происходящие в АМ при нарастающем дефиците O₂. Увеличивается энергодефицит, а также скорость пентозофосфатного пути окисления глюкозы, по крайней мере, тех реакций, которые обеспечивают восстановление НАДФ в НАДФН•Н⁺.

Если попытаться экстраполировать выявленную картину *in vitro* на ситуацию *in vivo*, то логично допустить среди неотложных мероприятий при состояниях, сопряженных с гипоксией и гипертермией, направить усилия, прежде всего, на восстановление нормального снабжения тканей кислородом. Поэтому предметом дальнейших исследований является конкретная разработка подобных мероприятий.

Литература

1. Ерохин В. В., Филиппенко Л. Н. Макрофаги легких // Пробл. туберкулеза. — 1980. — №11. — С. 54—60.
2. Кассиль В. Л., Выжигина М. А., Лескин Г. С. Искусственная и вспомогательная вентиляция легких. — М.: Медицина, 2004. — 480 с.
3. Кассиль В. Л., Золотокрылина Е. С. Острый респираторный дистресс-синдром. — М.: Медицина, 2003. — 224 с.
4. Лобанова Е. М. Влияние сочетанного действия гипоксии гипертермии на фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов // Сборник научных работ «Труды молодых ученых», Минск, 2004, с. 77-80.
5. Малышев И. Ю., Монастырская Е. А., Смирин Б. В., Манухина Е. Б. Гипоксия и оксид азота // Вестн. Рос. АМН. — 2000. — №9. — С. 44 — 48.
6. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. — Ленинград: Изд-во ленингр. ун-та —1982. — 272 с.
7. Fry D. E. Fever: basic mechanisms and management // Postoperative fever. / Mackowiak P. A. Eds. — NY., 1991. — P. 243—254.
8. Kisala J. M., Ayala A. A model of pulmonary atelectasis in rats: activation of alveolar macrophage and cytokine release // Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., —1993. —V. 264. — P. 610—614.
9. Leeper-Woodford S. K., Detmer K. Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF- κ B expression // Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. —1993.—V. 276. — P. 909—916.

10. Madjdpour C., Jewell U.R., Kneller S., Ziegler U. and all. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation // *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* —2003. — V. 284. — P. 360—367.
11. Paddenbergh R., Ishaq B., Goldenberg A., Faulhammar P. and all. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature // *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* —2003. — V. 284. — P. 710—719.
12. Powell C. S., Jackson R. M. Mitochondrial Complex I, aconitase and succinate dehydrogenase during hypoxia-reoxygenation: Modulation of enzyme activities by MnSOD // *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* —2003. — V. 285. — P. 189 — 198.
13. Salvucci M. E., Hendrix D. L., Wolfe G. R. Effect of high temperature on the metabolic processes affecting sorbitol syntes in the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* // *J. Insect Physiol.* — 1999. — V. 45, N1. — P. 21—27.
14. Semenza L. Gregg. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease // *Respir. Res.* — 2000, №1.— P. 159—162.
15. Semenza G. L., Roth P. H., Fang H. M., Wang G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1// *J. Biol. Chem.*—1994.— V. 269.— P.23757—23763.
16. Yu Aimee Y., Frid M. G., Shimoda L. A., Wiener L. A., Stenmark K. and Semenza G. L. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung // *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 1998. — V.275. — P. 818—826.