

Фагоцитарная активность стимулированных альвеолярных макрофагов в условиях гипоксии и гипертермии



ЛОБАНОВА
Елизавета
Михайловна, аспирант
кафедры
биологической химии

Исследовалось влияние сочетанного действия гипоксии и гипертермии на фагоцитарную активность АМ, стимулированных известными клеточными модуляторами - тетрафорболмеристилацетатом (ТФА), дибутирил цАМФ и АТФ. Установлено, что при нормальных условиях только ТФА способен усиливать фагоцитоз АМ, однако при развитии гипоксии стимулирующий эффект ТФА исчезает. Введение в среду ТФА, либо дибутирил цАМФ достоверно снижало активность стимулированных АМ при развитии острой гипоксии, в то время как ингибирующий эффект АТФ оставался одинаковым как в случае нормального снабжения кислородом, так и при гипоксии. Повышение температуры в системе от 37 до 42°C либо не изменяло величину ФП (стимулирование АТФ, дибутирил цАМФ), либо даже усугубляло ингибирующий эффект гипоксии (стимулирование ТФА).
Ключевые слова: ТФА, АТФ, цАМФ, фагоцитоз, альвеолярные макрофаги, гипоксия, гипертермия.



ТАГАНОВИЧ
Анатолий Дмитриевич
– доктор медицинских
наук, профессор, зав.
кафедрой
биологической химии

Lobanova E.M., Taganovich A.D.
Stimulated alveolar macrophages phagocytic activity in the hypothermic and hypoxic conditions. We studied the effect of exposure to hypoxia and high temperature on the phagocytosis of phorbol myristate acetate (PMA), dibutyryl cAMP or ATP-stimulated AM. Our data shows that only PMA in usual condition could increase the phagocytic activity of AM, but this effect disappeared after the exposure to hypoxia. The administration of PMA or dibutyryl cAMP, unlike ATP, significantly reduced the phagocytosis of AM in hypoxic conditions. High temperature didn't change phagocytic activity after either dibutyryl cAMP or ATP stimulation both in air and hypoxia environment but even induced the inhibitory effect of hypoxia after PMA administration.
Key words: PMA, ATP, cAMP, phagocytosis, alveolar macrophages, hypoxia, high temperature.

Развитие острой альвеолярной гипоксии при воспалении мозга, интоксикации, повреждении грудной клетки, обструкции верхних дыхательных путей и других патологических процессах является общеизвестным фактом. Часто это состояние сопровождается резким повышением температуры. Многие исследователи сконцентрировали свое внимание на процессах обратного насыщения кислородом после гипоксии, мало обращаясь к изучению непосредственного воздействия сочетанных условий гипоксии и гипертермии на функциональное состояние клеток легких [6]. Однако известно, что даже кратковременное воздействие острой гипоксии может привести к повреждению легочной ткани [1], в то время как действие на животных

высокой температуры снижает выраженность легочных повреждений, обусловленных сепсисом [7].

Одними из первых клеток, появляющихся в очаге воспаления легочной ткани являются макрофаги. Наиболее высоко дифференцированы из них - альвеолярные макрофаги (АМ). Расположенные на поверхности альвеол и мелких бронхов, они контактируют с вдыхаемыми микроорганизмами и другими веществами, поглощая убивая и переваривая их. АМ действуют не только как фагоциты, но также секретируют биологически активные продукты и поэтому играют важную роль в регуляции воспалительных реакций [2,9]. Этот бесспорный на сегодняшний день факт позволяет предположить, что изменения функциональной активности АМ в условиях низкого содержания альвеолярного кислорода и повышенной температуры могут определять течение и исход заболевания. Поэтому целью настоящей работы было изучение влияния совместного действия гипоксии и гипертермии на один из важнейших факторов неспецифической резистентности организма – поглотительную способность АМ.

Методика: Альвеолярные макрофаги крыс получали из бронхо-альвеолярной лаважной жидкости. Для этого проводили лаваж изолированных легких раствором, содержащим 140 ммоль NaCl, 5 ммоль KCl, 2,5 ммоль фосфатный буфер, 10 ммоль HEPES, 6 ммоль глюкоза, 0,2 ммоль EGTA, pH 7,40. Лаважную жидкость фильтровали и центрифугировали в течение 10 минут, при 900 оборотах в минуту и температуре 40С. Клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл питательной среды DME (Sigma, США) с добавлением в нее антибиотиков (пенициллин, гентамицин) и L-глутамин. Далее в среду вводили модуляторы клеточного метаболизма - тетрафорболмиристилацетат (ТФА), дибутирил цАМФ и АТФ (Sigma, США) в конечной концентрации 10^{-7} , 10^{-4} и 10^{-5} соответственно. Клеточную суспензию высевали на пластиковые чашки Петри (Falcon, ФРГ) в конечной концентрации $2,5 \cdot 10^5$ макрофагов на чашку (количество клеток подсчитывали в камере Горяева) и инкубировали 2 часа в условиях нормального снабжения кислородом и в условиях гипоксии (1.-10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂; 2.- 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) в интервале температур 37С-42С. АМ выделяли из смеси альвеолярных клеток путем прилипания их к поверхности чашек Петри. После инкубации жидкую фазу отсасывали, к прилипшим макрофагам добавляли свежую питательную среду (без антибиотиков) и 0,1 мл бактериальной суспензии *St. aureus* из расчета $5 \cdot 10^4$ на чашку. После 1 часа инкубации чашку промывали, клетки фиксировали метанолом, окрашивали по Романовскому-Гимза и микроскопировали с применением иммерсионного объектива. Оценивались фагоцитарный показатель (ФП) – процент фагоцитирующих клеток из общего числа макрофагов и фагоцитарное число (ФЧ) - среднее количество микробных частиц, поглощенных 1 активным макрофагом. Контролем служили АМ, инкубировавшиеся при 37С и нормальном снабжении кислородом.

Все эксперименты проведены тоекратно, полученные данные обработаны методом вариационной статистики. Различия значений считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение: Гипоксия подавляла фагоцитарную активность АМ уже при 37С. Уменьшение концентрации кислорода в системе до 10%, а затем - до 5% приводило к достоверному снижению ФП на 26% и 32%, соответственно. При введении в среду инкубации известных модуляторов метаболизма АМ: тетрафорболмиристилацетата (ТФА), дибутирил цАМФ и АТФ,- в нормальных условиях (20% O₂) только один из них, ТФА, оказывал стимулирующий эффект на функциональную активность АМ. ФП

возрастал на 14% по сравнению с контролем. Другие же модуляторы, АТФ и дибутирил цАМФ, угнетали фагоцитоз на 49% и 63%, соответственно.

В условиях гипоксии способность ТФА стимулировать фагоцитарную активность исчезала. Даже высокий показатель среднеквадратичной ошибки эксперимента не оказывал влияния на замеченную тенденцию. Добавление ТФА в среду инкубации, наоборот, приводило к снижению величины ФП АМ, причем как по отношению к контролю, так и по отношению к нестимулированным клеткам в условиях развития соответствующего уровня гипоксии (табл. 1). Известно, что ТФА повышает поглотительную способность АМ, усиливая потребление O_2 клетками и активируя их энергетический метаболизм [4,8]. Исходя из этих сведений, потеря активирующей способности ТФА в условиях острой гипоксии представляется закономерным явлением.

Данные литературы о действии внеклеточного АТФ на активность АМ неполные и противоречивые. Некоторые исследователи полагают, что АТФ не влияет на метаболическую и функциональную активность АМ, а лишь угнетает их пролиферацию [5]. Описано резко негативное влияние высоких концентраций внеклеточного АТФ (10-4 М) на жизнеспособность АМ [10]. Полученные нами результаты доказывают, что добавление АТФ (10-3 М) к среде инкубации достоверно снижает фагоцитоз АМ в нормальных условиях, не влияя на их жизнеспособность (96% по сравнению с контролем).

Известно, что АТФ реализует свой эффект на АМ, связываясь с пуриnergическими рецепторами на поверхности клеточной мембраны с последующим запуском аденилатциклазного (АЦ) каскадного механизма [10]. Можно предположить, что введение АТФ в наших исследованиях активирует АЦ. В результате нарастает уровень внутриклеточного цАМФ, который, в свою очередь, запускает активацию ряда протеинкиназ, что приводит к угнетению функциональной активности АМ.

Косвенно в пользу такого предположения свидетельствуют результаты проведенных нами экспериментов с дибутирил цАМФ. Внесение его в среду культивирования АМ в форме, которая проникает через мембрану в цитозоль клеток, приводило к снижению их фагоцитарной активности в условиях нормоксии. Однако при углублении гипоксии дальнейшее снижение активности стимулированных АМ имело место только под влиянием дибутирил цАМФ. В то же время ФП АМ, инкубированных в присутствии АТФ, оставался одинаково низким как в случае нормального снабжения кислородом, так и при 10% или 5% гипоксии. Можно лишь предположить, что при развитии в клетке гипоксии либо снижается сродство АТФ к мембранным рецепторам клетки, либо происходят нарушения в функционировании АЦ каскадного механизма передачи сигнала.

Таблица 1

Влияние гипоксии на фагоцитарную активность стимулированных альвеолярных макрофагов при нормальной температуре (37°C)

	Контроль	АТФ	ТФА	цАМФ
Фагоцитарный показатель (жизнеспособность)				
Нормоксия (20% O ₂)	34,7±0,4 (100%)	13,3 ±1,3* (96%)	40,0± 6,0 (98%)	17,7± 7,8 (97%)
10% O ₂	26,0±0,1* (99%)	13,0±1,0*(**) (93%)	17,7±3,4* (100%)	24,0 ±7,0 (97%)
5% O ₂	23,7 ±0,1* (97%)	13,7 ±1,8*(**) (98%)	22,0 ±10,5 (95%)	9,3± 0,3*(**) (99%)

Примечание: *- данные достоверны по сравнению с контролем, ** - данные достоверны по отношению к ФП клеток, инкубированных без модуляторов, в условиях соответствующей гипоксии.

На следующем этапе исследовалось влияние гипертермии на функциональную активность АМ как в условиях нормального снабжения кислородом, так и в сочетании с гипоксией. В литературе есть сведения о резком увеличении скорости эндоцитоза АМ при постепенном повышении температуры от 200 до 400С [3]. Нам не удалось подтвердить эти сведения. Наоборот, полученные данные показывают, что повышение температуры от 37 до 420С в условиях нормоксии не изменяет функциональную активность АМ, а при гипоксии увеличивают ингибирующий эффект нехватки O₂ на ФП АМ (рис.1а).

В присутствии клеточного модулятора ТФА и при последующем инкубировании АМ при различной температуре угнетение фагоцитоза имело место, как в условиях гипоксии, так и при нормальном снабжении кислородом (рис.1б). Введение АТФ и дибутирил цАМФ не приводило к существенным изменениям фагоцитарной активности АМ в условиях гипертермии (рис. 1в, г). Обращает на себя внимание тот факт, что в присутствии клеточных модуляторов наблюдалось увеличение фагоцитарной активности при субфебрильной (38оС) температуре, однако с дальнейшим повышением температуры ФП возвращался на исходный уровень (АТФ, дибутирил цАМФ), либо даже снижался (ТФА).

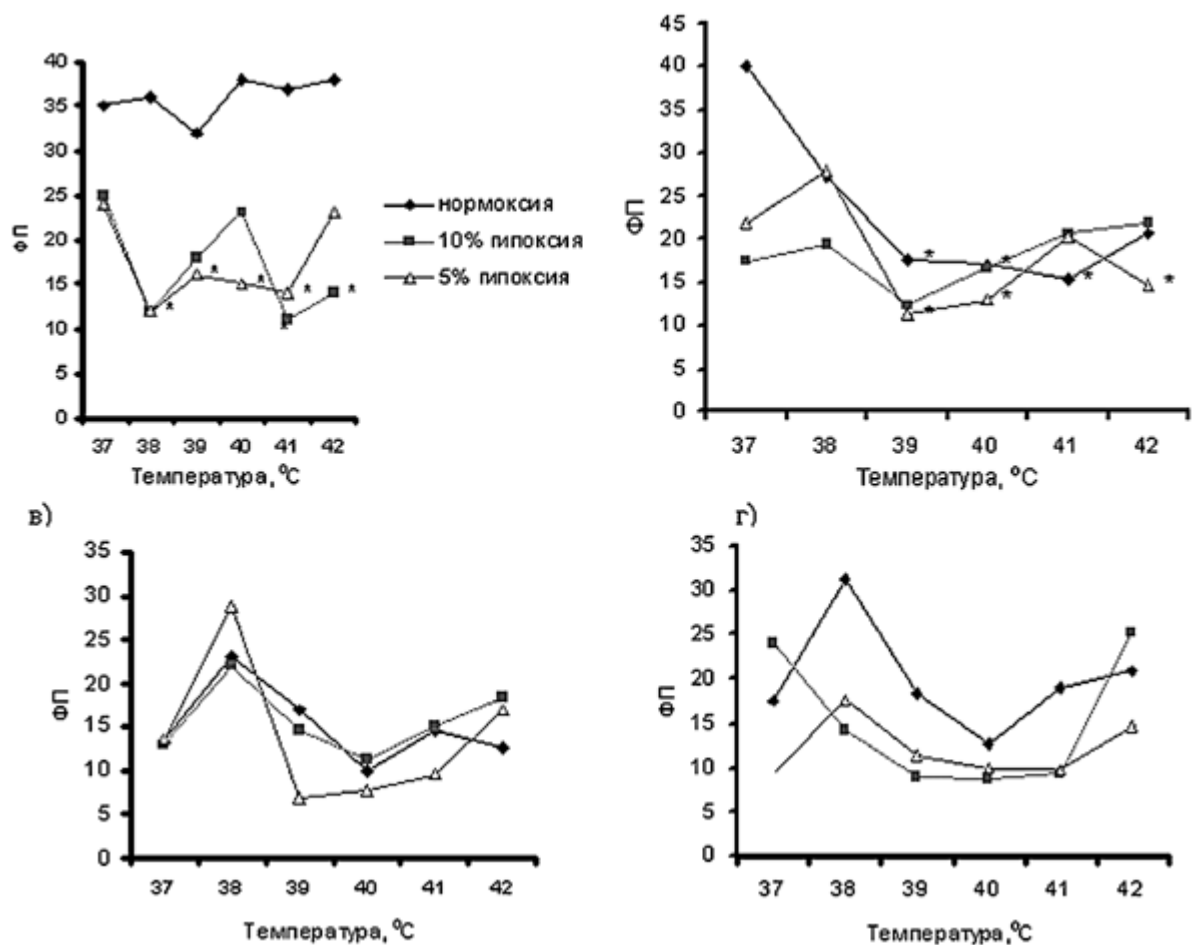


Рис.1. Влияние гипоксии и гипертермии на ФП альвеолярных макрофагов: а) клетки инкубировались без модуляторов, б) в среду инкубации введен ТФА, в) в среду инкубации введен АТФ, г) в среду инкубации введен дибутирил цАМФ.

Примечание: *на рис.1а-г обозначает статистически достоверное изменение данных по отношению к величине ФП при 37°C и соответствующей концентрации O₂.

Эксперименты по исследованию влияния гипоксии и гипертермии на ФЧ АМ показали, что использовавшиеся добавки ТФА, АТФ и дибутирил цАМФ, сами по себе приводили к достоверному снижению данного показателя (рис.2). Воздействие гипоксии практически в одинаковой степени уменьшало величину ФЧ как в присутствии клеточных модуляторов, так и в их отсутствие. Увеличение степени гипоксии (от 10% до 5% O₂) не приводило к усугублению первоначально возникших изменений. Сочетание гипоксии и гипертермии фактически не сказывалось на изменении величины ФЧ. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что развитие в системе гипоксии и гипертермии приводит к достоверному уменьшению числа фагоцитирующих АМ, практически не изменяя число поглощенных микробных частиц.

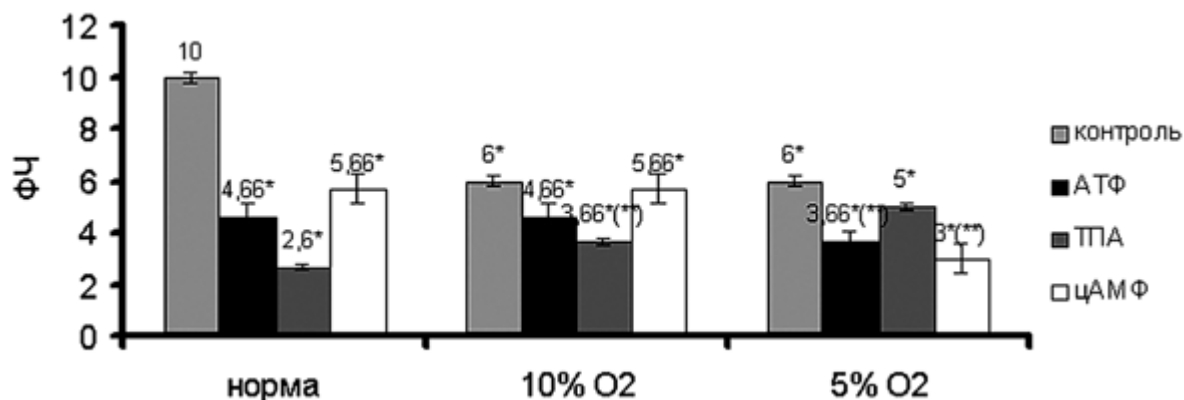


Рис.2. Влияние гипоксии на ФЧ стимулированных и не стимулированных альвеолярных макрофагов.

*- данные достоверны по отношению к контролю; **- данные достоверны по отношению к показателю ФЧ при нормоксии в присутствии соответствующего стимулятора.

Таким образом, проведенное нами исследование позволяет прийти к заключению, что при нехватке кислорода происходит подавление поглотительной способности АМ. Оно проявляется даже в условиях нормотермии. Рост температуры усугубляет эти изменения. Введение же в систему известных клеточных модуляторов, таких как ТФА, АТФ и дибутирил цАМФ либо не изменяло (АТФ и дибутирил цАМФ), либо даже обостряло ситуацию (ТФА). Анализ возможных механизмов обнаруженного явления наводит на мысль о необходимости проведения специальных экспериментов по исследованию аденилатциклазной системы АМ в условиях сочетанного воздействия гипоксии и гипертермии.

На отдельном месте стоит оценка значимости выявленного ингибирующего влияния гипоксии и гипертермии на фагоцитарную активность АМ. Вероятно, это нежелательное явление, которое снижает эффективность участия этих клеток в формировании защитного ответа в легких. Вместе с тем, следует принять во внимание и то обстоятельство, что снижение функциональной активности АМ в очагах воспаления сопровождается повышением секреторной способности этих клеток. В частности, сообщается об увеличенной секреции ими провоспалительных медиаторов [6]. Полученные данные следует учитывать при разработке схем терапии заболеваний легких, сопровождающихся гипоксией и повышенной температурой. Очевидно, что предлагаемые средства могут быть не только малоэффективными, но и усугубить болезнетворный процесс, если они будут реализовывать свое действие посредством аденилатциклазного-протеинкиназного механизма проведения внешнего сигнала в клетку, направленного на повышение уровня цАМФ.

Литература

1. Beck-Schimmer B, Schimmer RC. Hypoxia mediates increased neutrophil and macrophage adhesiveness to alveolar epithelial cells// Am J Respir Cell Mol Biol.-2001. - Vol.25. -P.780-787.
2. Bingisser R.M., Holt P.G. Macrophage-Derived Nitric Oxide Regulates T Cell Activation via Reversible Disruption of the Jak3/STAT5 Signaling Pathway//Swiss. Med Wkly. -2001. -Vol.131. -P.171-179.
3. Hiroshi Tomoda, Yasuo Kishimoto. Temperature Effect on Endocytosis and Exocytosis by Rabbit Alveolar Macrophages// The J. of Biol. Chem.-1989. -Vol. 264 (26). -P.15445-15450.
4. Hoidal IR, Repine JE. The effect of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure of human alveolar macrophages // Am J Pathol. -1978. – Vol. 91. - P. 469-82.

5. Kawasaki M, Ogino H. Extracellular ATP regulates the proliferation of alveolar macrophages// *Am J Respir Cell Mol Biol.*- 1994. - Vol. 10(5). – P.560-4.
6. Madjdpour C., Jewell U.R. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation// *Am J Respir Cell Mol Biol.*- 2003. - Vol. 284. – P.360-7.
7. Ribeiro SP, Villar J. Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF-alpha posttranslational regulation// *Am J Respir Crit Care Med.* –1996. – Vol. 154. - P.1843-50.
8. Selishcheva AA, Atruz OM. Effects of liposomes of different phospholipid composition on the induction of respiratory burst in human blood monocytes and alveolar macrophages // *Membr Cell Biol.* - 2001. – Vol. 14(5). - P.637-47.
9. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury// *Am Rev Respir Dis.* –1990. - Vol. 141. - P.471-501.
10. Smith RA, Alvarez AJ. The P2X7 purinergic receptor on bovine macrophages mediates mycobacterial death// *Vet Immunol Immunopathol.* – 2001. – Vol. 10. – P. 249-62.