

УДК 577.152.199:616.056

Н. О. Мовсесян¹, Н. Х. Алчуджян¹, Г. В. Элбакян²,
академик К. Г. Карагезян²

**Влияние N^α-пара-бутоксibenзоил-L- аргинина на
продукцию оксида азота тромбоцитами и иммунокомпетентными
клетками крови**

(Представлено 25/XII 2003)

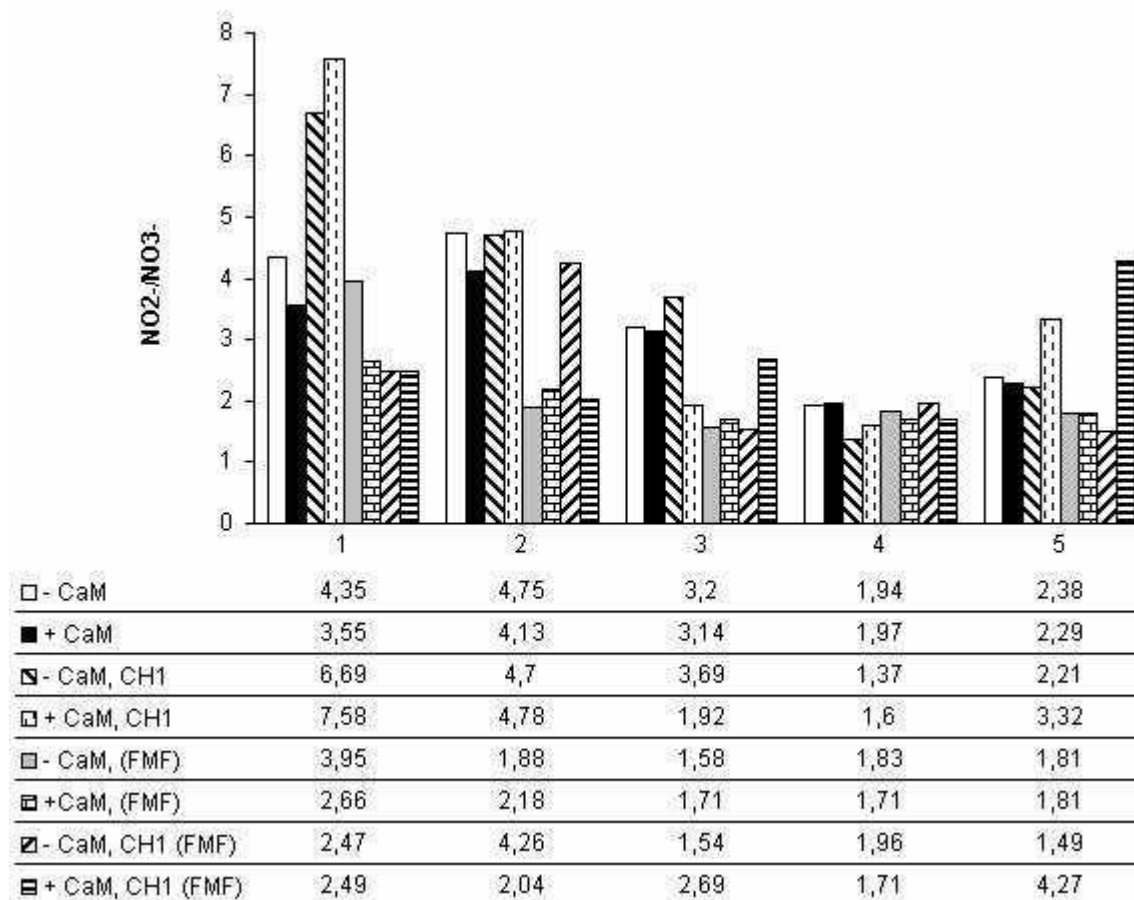
Тромбоциты и иммунокомпетентные клетки крови (нейтрофильные гранулоциты, моноциты и лимфоциты) участвуют в воспалительной реакции с вовлечением синтазы оксида азота (КФ 1.14.13.39, NOS), продуцирующей из L-аргинина и некоторых аргинин содержащих пептидов оксид азота (NO) - важнейший регулятор метаболизма клеток и физиологических функций организма в целом [1,2]. Генетически различающиеся три изоформы NOS проявляют различные каталитические свойства. В частности, для обеспечения активности нейронального, NOS-1, и эндотелиального, NOS-3, изоферментов необходимо присутствие ионов Ca²⁺, обеспечивающих связывание одного из кофакторов NOS - кальмодулина (CaM) с соответствующим доменом. Активность "индуцибельного" изофермента, NOS-2, благодаря прочной связи с CaM в сравнительном аспекте не зависит от Ca²⁺ [3]. Согласно современным представлениям NOS-2 - один из эффекторов клеточного иммунитета, активирующийся при хронических инфекциях, аутоиммунных болезнях, некоторых экстремальных состояниях организма, способный продуцировать NO в течение длительного времени (до нескольких дней), обеспечивая высокий уровень последнего [4]. При воспалениях NOS-2 выступает в роли регулятора активности лейкоцитов [2]. Последние, преодолевая гематоэнцефалический барьер, оказывают влияние на метаболические реакции в ЦНС с образованием цитокинов, напрямую связанных с индукцией NOS-2 в мозге [5]. В этой связи особый интерес представляет изучение в клетках крови метаболического пути L-аргинин-NO, а также возможностей его регулирования, что явилось предметом наших исследований.

Были обследованы здоровые женщины (38-51 год, n = 3) и пациентки с диагнозом периодическая болезнь (ПБ) (16-60 лет, n = 4). Кровь из локтевой вены забирали утром натощак. Из крови выделяли тромбоциты, нейтрофилы, моноциты и лимфоциты [6]. Из полученных клеточных взвесей готовили суспензию в 20 mM HEPES буфере (pH 7.05) и в аликвотах определяли активность NOS. Действие CH1 на активность NOS определяли *in vitro* введением препарата в реакционную смесь (5 мкмоль/мл). Реакцию NOS запускали добавлением испытуемых фракций в инкубационную смесь с конечным объемом 1.32 мл: 20 mM HEPES (pH 7.05) (содержащий 1 mM дитиотреитол, 1 mM ЭДТА, 3 mM MgCl₂), 0.5 mM NADPH, 50 мкМ (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина, 5 мкМ FAD, 5 мкМ FMN, 5 mM L-аргинина. В соответствии с требованиями эксперимента в пробы вносили CaM (10 мкг/мл). Об активности NOS судили по количеству продуцируемых из L-аргинина за 24 ч инкубации нитрит/нитрат анионов (мкг/мл крови), определяемых реакцией диазотизации,

спектрофотометрически при длине волны 546 нм [7].

Согласно литературным источникам [8] основная α -аминогруппа L-аргинина участвует в обеспечении субстратной специфичности, в частности, стерического эффекта, необходимого для реакции NOS. Было изучено влияние вновь синтезированного нами аналога L-аргинина с замещённой α -аминогруппой - N ^{α} -пара-бутоксibenзоил-L-аргинина (препарат CH1) на продукцию биогенного NO в тромбоцитах, иммунокомпетентных клетках, а также в цельной крови для оценки совокупного действия изоферментов NOS всех форменных элементов (ФЭ). Литературные данные об активности NOS в клетках крови противоречивы, что, вероятно, обусловлено трудностями в определении NO вследствие его быстрого превращения в пероксинитрит (ONOO-), как это сообщалось относительно активированных липополисахаридом гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов периферической крови человека [9,10], а также активного взаимодействия NO с железо- и гемсодержащими белками, сульфгидрильными группами различных соединений [1,2,11].

Нам удалось выявить активность NOS в исследуемых ФЭ человека, поддерживая pH 7.05, при котором протонированная форма пероксинитрита неустойчива и распадается на OH- и NO₂ - радикалы со скоростью $0.4 \pm 0.01 \text{ c}^{-1}$ [12]. Определение активности NOS-2 осуществляли на основе предварительной обработки ЭДТА, хотя и с потерями, поскольку для обеспечения оптимального связывания CaM с NOS-2 человека также требуется небольшое количество кальция, а связывающий кальций ЭДТА, равно как трифторперазин - антагонист кальмодулина, снижает эту активность на 50-65% [13]. Активность всех изоформ NOS ФЭ оценивали введением CaM в состав реакционной смеси.



Влияние in vitro N ^{α} -пара-бутоксibenзоил-L-аргинина (CH1) на синтез NO в форменных элементах и цельной крови здоровых женщин и больных ПБ (FMF). По оси абсцисс: 1 - кровь; 2 - тромбоциты; 3 -

нейтрофилы; 4 - лимфоциты; 5 - моноциты. По оси ординат: нитрит/нитрат анионы (мкг/мл крови, время инкубации - 24 ч). Представлены средние результаты опытов.

На рисунке представлены средние результаты анализа крови женщин: здоровых доноров и больных ПБ, или семейной средиземноморской лихорадкой (FMF), с аутосомно-рецессивным типом наследования, характерным для армянской популяции [14]. Не было обнаружено прямой корреляции между интенсивностью продукции NO исследуемыми ФЭ и таковой в цельной крови, что указывает на возможное взаимовлияние фракций, проявление активности эритроцитарной NOS, а также влияние соединений плазмы на активность NOS ФЭ [15]. В тромбоцитах помимо активности Ca^{2+} /CaM-зависимой NOS-3 [1] была обнаружена Ca^{2+} /CaM-независимая активность NOS, что, возможно, обусловлено проявлением активности митохондриальной изоформы фермента. У здоровых женщин во всех фракциях, кроме лимфоцитов, активность NOS в отсутствие CaM в инкубационной среде превалировала над таковой при наличии CaM. Возможно, в условиях долговременной инкубации клеток крови человека CaM оказывает дестабилизирующее влияние на фермент и/или имеет место более активное метаболизирование NO. Апробированный нами препарат CH1 в отсутствие CaM в инкубационной среде снижал у здоровых женщин интенсивность образования NO в лимфоцитах, моноцитах и в меньшей степени в тромбоцитах, одновременно повышая её в нейтрофилах и цельной крови. CaM изменял влияние CH1 на активность NOS в лимфоцитах и моноцитах от ингибирования к стимулированию, а в цельной крови их совместное действие способствовало ещё большему повышению активности фермента. Инверсия действия CH1 на NOS в присутствии CaM проявлялась в заметном снижении аргинин-зависимого синтеза NO нейтрофилами. По-видимому, NOS-2 и Ca^{2+} /CaM-зависимые изоформы NOS отличаются по способности метаболизировать CH1, и полученные нами результаты отражают особенности изоферментного спектра NOS исследуемых клеток крови человека. На рисунке представлен биохимический паттерн активности NOS ФЭ крови больных ПБ. У пациенток с ПБ во всех исследуемых фракциях наблюдался пониженный уровень активности NOS по сравнению со здоровыми женщинами, что может быть обусловлено ретроингибированием фермента нитритами и/или цитруллином, содержание которых в плазме больных ПБ было повышено (данные не указаны). Интересно, что в нейтрофилах, играющих важную роль в развитии и течении воспалительной реакции при ПБ, наблюдалась самая низкая активность NOS. У больных была резко снижена и активность NOS тромбоцитов. Отметим, что NO активирует растворимую гуанилатциклазу и подавляет экспрессию Р-селектина, влияя на взаимодействие лейкоцитов и тромбоцитов и препятствуя их агрегации и адгезии в процессе воспалительной реакции [1,4]. У пациенток с ПБ во всех ФЭ, кроме лимфоцитов, активность NOS в присутствии CaM была выше, чем без CaM - картина, полностью противоположная таковой у здоровых доноров. Интересно, что у больных ПБ CH1 значительно повышал продукцию NO тромбоцитами и лимфоцитами, тогда как в отсутствие CaM он снижал активность NOS. И наоборот, в нейтрофилах и моноцитах стимулирование активности фермента препаратом CH1 наблюдалось лишь в присутствии CaM (в 1.7 и 2.9 раза, соответственно).

Таким образом, нами обнаружены изменения в биохимическом паттерне активности NOS в тромбоцитах и иммунокомпетентных клетках крови человека при ПБ, подтвержденные селективным влиянием на активность изоформ NOS ФЭ нового N^{α} -производного L-аргинина в норме и при ПБ.

Авторы выражают благодарность С. А. Казаряну за любезно предоставленный препарат N^α-пара-бутоксibenзоил-L- аргинина.

Институт биохимии им Г. Х. Бунятына НАН РА

Институт молекулярной биологии НАН РА

Литература

1. *Серая И. П., Нарциссов Я. Р.* - Успехи совр.биол. 2002. Т.122. N3 С. 249-258.
2. *Hickey M. J.* - Clin. Science. 2000. V. 100. №1. P. 1-12.
3. *Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G.* - Biochem J. 2001. V. 357. № 3. P. 593-615.
4. *Esh T., Stefano G. B., Fricchione G. L., Benson H.* - Med. Sci. Monit. 2002. V. 8. № 6. P. 103-118.
5. *Licinio J., Prolo P., McCann S. M., Wong M.* - Mol.Med. 1999. V. № 5. P. 225-232.
6. *Фрик Г., Прейснер З. С., Иенсен Г. Л., Бурмейстер Ю.* В кн.: Иммунологические методы (под ред. Х.Фримеля). М. Мир. 1979. с. 518.
7. *Tracey W. R., Linden J., Peach M. J., Johns R. A.* - J. Farm. Exp.Ther. 1989. V. 252. № 3. P. 922-928.
8. *Hrabak A., Bajor T., Temesi A.* - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. V. 198. №1. P. 206-212.
9. *McBride A., Brown G. C.* - FEBS Lett. 1997. V. 417. № 2. P. 231-234.
10. *Gagnon C., Leblond F. A., Filep J. G.* - FEBS Lett. 1998. V. 431. № 1. P. 107-110.
11. *Проскуряков С. Я., Бикетов С. И., Иванников А. И., Скворцов В. Г.* - Иммунология. 2000. Т. 4. № 1. С. 9-20.
12. *Pryor W. A., Gueto R., Jin X., Koppenol W. H., Uppu R. M.* - Free Radl.Med. 1995. V.18. P. 75-83.
13. *Geller D. A., Lowenstein C. J., Shapiro R. A., Nussler A. K., DiSilvio M., Wang S. C., Nakayama D. K., Simmons R. L., Snyder S. H., Billiar T. R.* - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V.90. P. 3491-3495.
14. *Оганесян З. Р., Айрапетян А. С., Шахсуварян Г. Р., Атаян К. Е., Саркисян Т. Ф.* - Мед. наука Армении. 2002. Т. 42. № 2. С. 47-52.
15. *Vallance P.* - Nitric Oxide (R.J. Gryglewski, P. Minuz, Eds.) IOS Press. 2001. V. 317. P. 53-56.

Ն. Հ. Մովսեսյան¹, Ն. Խ. Ալշուջյան¹, Գ. Ո. Էլբակյան²,
ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյոզյան²

***N^α*-պարա-բութոքսիբենզոիլ- L-արգինինի ազդեցությունը ազոտ
օքսիդի արտադրանքի վրա արյան թրոմբոցիտներում և իմունակումպետենտ
բջջներում**

Ազոտի օքսիդի (NO) սինթեզը L-արգինինից ուսումնասիրվել է մարդու արյան ձևավոր տարրերում (ՉՏ)՝ թրոմբոցիտներում, նեյտրոֆիլներում, մոնոցիտներում, լիմֆոցիտներում, ինչպես նաև ամբողջական արյան մեջ: NO-ի սինթեզը որոշվել է դիագնոստիկացման ռեակցիայի միջոցով: NO սինթազի (NOS) ակտիվությունը ուսումնասիրվող արյան ՉՏ-ում տարբերվում է ու փոփոխվում կալմոդուլինի (CaM) ազդեցության ներքո: Առողջ (38-51 տարեկան, n = 3) և պարբերական հիվանդությամբ (16-60 տարեկան, n = 4) տառապող կանանց մոտ գրանցվել են ՉՏ NOS-ի իզոֆերմենտային սպեկտրի փոփոխություններ նկատելի շեղումով դեպի Ca²⁺/CaM -կախյալ NOS-ի ակտիվությունը: *N^α*-պարա-բութոքսիբենզոիլ-L-արգինինը ցուցաբերել է ընտրողական ազդեցություն մարդու վերոհիշյալ կենսաքիմիական պատկերի վրա in vitro պայմաններում :