

Влияние нового N^α-производного L-аргинина на синтез оксида азота в форменных элементах крови

К.А. Барсегян, С.А. Казарян, Г.А. Геворкян, Н.О. Мовсесян, Н.Х. Алчуджян

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА,

Институт тонкой органической химии им. А.Л. Миндзояна НАН РА

375014 Ереван, ул. Севака 5/1

Ключевые слова: аргинин, оксид азота, периодическая болезнь, синтаза оксида азота, форменные элементы

Представления о молекулярных механизмах, регулируемых в процессе воспалительной реакции тромбоцитами и иммунокомпетентными клетками крови (нейтрофильные гранулоциты, моноциты и лимфоциты), расширились с открытием синтазы оксида азота (КФ 1.14.13.39, NOS), продуцирующей из L-аргинина и некоторых аргининсодержащих пептидов оксида азота (NO) – важнейшего регулятора метаболизма клеток и физиологических функций организма в целом [3]. Генетически различающиеся три изоформы NOS проявляют различные каталитические свойства и характеризуются определенными особенностями. В частности, для обеспечения активности нейронального и эндотелиального изоферментов (NOS-1 и NOS-3 соответственно) необходимо присутствие ионов Ca²⁺, обеспечивающих связывание кальмодулина (CaM) – одного из кофакторов NOS с соответствующим доменом. В случае "индуцибельного" изофермента (NOS-2) CaM находится в довольно прочной связи с ферментом, чем обусловлена сравнительная независимость этой изоформы от Ca²⁺ [5]. Согласно современным представлениям, NOS-2 – это один из эффекторов клеточного иммунитета, активирующийся при хронических инфекциях, аутоиммунных болезнях, некоторых терминальных состояниях организма, способный продуцировать NO в течение длительного времени (до нескольких дней), благодаря чему обеспечивается высокий уровень последнего [5,6]. При воспалениях NOS-2 выступает в роли регулятора активности лейкоцитов [9]. Последние преодолевают гематоэнцефалический барьер и, высвобождая цитокины, оказывают влияние на метаболические реакции в ЦНС, включая индукцию NOS-2 в тканях мозга [11]. 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.

Материал и методы

Эксперименты проводили на беспородных половозрелых самцах белых крыс массой 150–200 г. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом, обескровливали и кровь забирали для дальнейшей обработки. Были также обследованы здоровые женщины (38–51 год, n=3) и пациентки с диагнозом периодическая болезнь (ПБ) (16–50 лет, n=4). Кровь из локтевой вены забирали утром натощак. Из крови выделяли тромбоциты, а также нейтрофилы и мононуклеары с учетом видовых различий их плотностей у человека и крыс [4]. Моноциты отделяли от лимфоцитов селективной адгезией на пластике и смывали 0,02% ЭДТА. После промывания 20 мМ HEPES буфером (pH 7,05) из полученных клеточных взвесей готовили суспензию и в аликвотах определяли активность NOS. Действие нового N^α-производного L-аргинина – N^α-бензилиден-L-аргинина (препарат CH1) на активность NOS человека определяли *in vitro* введением препарата в реакционную смесь (5 мкмоль/мл). У крыс влияние CH1 оценивали *in vivo*. Животные были разделены на 4 группы (по 3 крысы в каждой): I группа – интактные крысы, II – контроль с введением в/б физиологического раствора (растворитель препарата), III и IV группы – опытные животные, которым инъецировали 0,5 мл препарата CH1 в дозе 300 и 3 мг/кг массы животного соответственно. Через 3 ч после введения указанных соединений животных декапитировали. Реакцию NOS запускали добавлением испытуемых фракций в инкубационную смесь с конечным объемом 1,32 мл: 20 мМ HEPES (pH 7,05) (содержащий 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ MgCl₂), 0,5 мМ NADPH, 50 мкМ (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина, 5 мкМ FAD, 5 мкМ FMN, 5 мМ L-аргинина. В пробирки в соответствии с требованиями эксперимента вводили CaM (10 мкг/мл). Об активности NOS судили по количеству продуцируемых из L-аргинина за 24 ч инкуба-

ции нитрит-нитрат анионов (мкг/мл крови), которые определяли реакцией диазотизации спектрофотометрически при длине волны – 546 нм [14]. Статистическую обработку данных выполняли с использованием t-критерия Стьюдента. В качестве критерия достоверности принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно литературным источникам [10], основная α -аминогруппа L-аргинина участвует в обеспечении субстратной специфичности, в частности стерического эффекта, необходимого для реакции NOS. Нами было изучено влияние вновь синтезированного нами аналога L-аргинина с заблокированной $\alpha\text{-NH}_2$ группой на продукцию биогенного NO в тромбоцитах, иммунокомпетентных клетках крови, а также в цельной крови для оценки совокупного действия изоферментов NOS всех форменных элементов (ФЭ). При этом было проведено сравнительное исследование активности NOS человека и крыс, поскольку, согласно последним сообщениям, есть различия в функционировании метаболического пути L-аргинин-NO в клетках человека и грызунов, используемых как модель инфекционного процесса [2]. Литературные данные в отношении активности NOS в клетках крови противоречивы, что, вероятно, обусловлено трудностями в определении NO вследствие его активного метаболизма: взаимодействие NO с железо- и гемсодержащими белками, сульфгидрильными группами различных соединений, а также быстрого превращения NO в пероксинитрит (ONOO^-) [3,5,12]. Так, специфическая реакция окисления дигидрорадамина - 123 в родамин пероксинитритом позволила продемонстрировать генерирование ONOO^- липополисахарид-активированными гранулоцитами, моноцитами и лимфоцитами периферической крови человека [7]. Нам удалось выявить активность NOS в исследуемых ФЭ человека в соответствующей инкубационной среде, поддерживая pH 7,05, при котором протонированная форма пероксинитрита неустойчива и распадается на OH^- и NO_2^- радикалы со скоростью $0,4 \pm 0,01 \text{ с}^{-1}$ [13]. Селективное определение активности NOS-2 осуществлялось благодаря предварительной обработке ЭДТА хотя и с потерями, поскольку для обеспечения оптимального связывания CaM с NOS-2 человека также требуется небольшое количество кальция, а ЭДТА, связывающий кальций и антагонист CaM – трифторперазин, снижают эту активность на 50–65% [8]. Таким образом, при введении CaM в состав реакционной смеси определялась активность всех изоформ NOS. На рис. 1 представлены результаты анализа крови женщин – здоровых доноров и больных ПБ, или семейной средиземноморской лихорадкой (FMF) с аутосомно-рецессивным типом наследования, характерной для

армянской популяции [1]. Нами не было обнаружено прямой корреляции между интенсивностью образования NO в исследуемых ФЭ и цельной крови, что указывает на возможное проявление в последней активности эритроцитарной NOS и/или влияние на активность NOS ФЭ соединений плазмы [15]. Кроме того, в тромбоцитах выявлялась Ca^{2+} /CaM-независимая активность NOS, что, возможно, обусловлено проявлением активности митохондриальной изоформы фермента, отличной от известной тромбоцитарной Ca^{2+} /CaM-зависимой NOS-3 [5]. У здоровых женщин активность NOS в отсутствие CaM в инкубационной среде во всех фракциях (кроме лимфоцитов) превалировала над таковой при наличии CaM, тогда как CaM стимулировал NOS ФЭ крыс. Возможно, в условиях долговременной инкубации клеток крови человека CaM оказывает специфическое дестабилизирующее влияние на фермент, и/или имеет место более активное метаболизирование NO. Апробированный *in vitro* препарат CH1 у здоровых женщин в отсутствие CaM снижал интенсивность образования NO в лимфоцитах, моноцитах и в меньшей степени в тромбоцитах, одновременно повышая ее в нейтрофилах и особенно в 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 повышению активности фермента. Инверсия действия CH1 на NOS в присутствии CaM проявлялась в заметном снижении аргининзависимого 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 рис. 1 представлены данные по биохимическому паттерну 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, поскольку их содержание в плазме 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, то есть проявлялась картина, полностью противоположная той, которая наблюдалась у здоровых доноров. Подобные изменения нашли свое

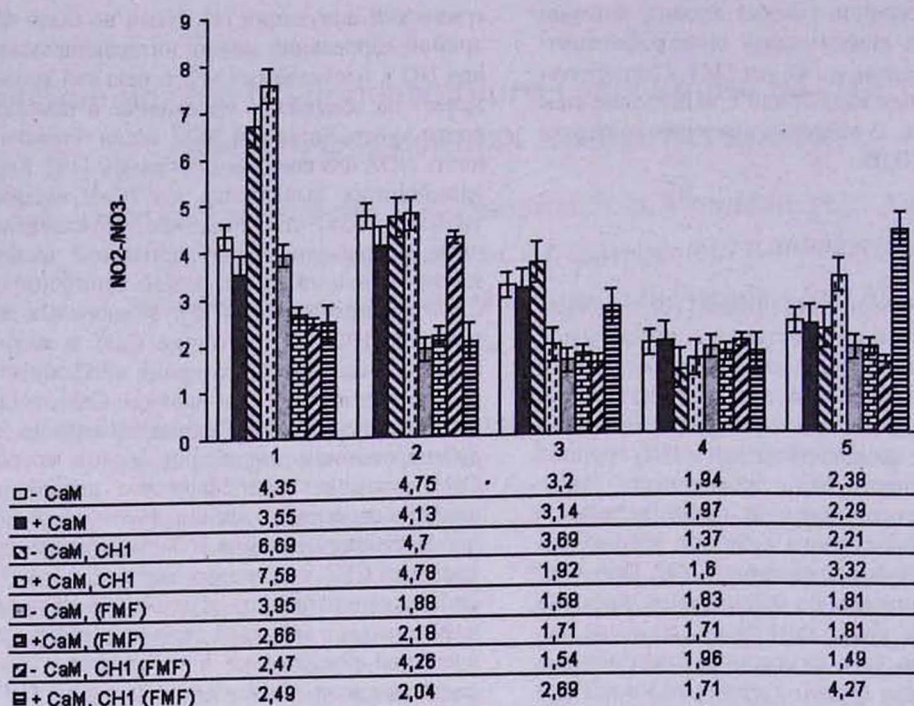


Рис.1. Влияние *in vivo* N^G- производного L- аргинина (CH1) на синтез NO в форменных элементах и цельной крови здоровых женщин и больных (FMF). По оси абсцисс: 1 – кровь; 2 – тромбоциты; 3 – нейтрофилы; 4 – лимфоциты; 5 – моноциты. По оси ординат: нитрит-нитрат анионы (мкг/мл крови), время инкубации – 24 ч.

отражение и в действии CH1, который у больных ПБ значительно повышал уровень NO, продуцируемого тромбоцитами и лимфоцитами в отсутствие CaM вплоть до нормы – введение последнего снижало активность NOS. И наоборот, в нейтрофилах и моноцитах стимулирование активности фермента препаратом CH1 наблюдалось лишь в присутствии CaM (1,7 и 2,9 раза, соответственно). Является ли это результатом сдвига в их изоферментном спектре в сторону Ca²⁺/CaM-зависимых изоформ NOS при ПБ еще предстоит выяснить. Не-исключено, что подавление активности изоферментов NOS, экспрессируемых в норме, и/или индуцирование ее определенной изоформы может играть роль в патогенезе ПБ.

На рис 2. отражены результаты изучения влияния CH1 *in vivo* на синтез NO из L-аргинина в форменных элементах и цельной крови крыс. Как видно из рисунка, инъекции сопровождалась развитием стрессорной реакции и изменением исследуемого биохимического паттерна крови крыс в виде заметного снижения активности NOS во всех фракциях по сравнению с таковой у интактных животных. Введение CaM в инкубационную смесь дестабилизировало NOS, что проявлялось в снижении ее активности особенно в нейтрофи-

лах и лимфоцитах. Препарат CH1 в дозе 300 мг/кг вызывал значительное повышение уровня нитритов в плазме с картиной полного ингибирования синтеза NO во всех фракциях за исключением цельной крови, в которой проявляется активность NOS всех ФЭ. Инъекции CH1 в дозе 3 мг/кг интенсифицировали синтез NO в цельной крови и снижали его в лимфоцитах, в то же время CH1 вызывал сдвиг в направлении превалирования Ca²⁺/CaM - зависимой активности NOS во всех исследуемых форменных элементах и особенно в тромбоцитах и нейтрофилах, возможно, отчасти за счет предотвращения дестабилизирующего эффекта CaM. Нами были обнаружены некоторые отличия в действии препарата CH1 на активность NOS ФЭ крови человека и крыс. Так, в отсутствие CaM в инкубационной пробе CH1 *in vivo* вызывал значительно большую степень повышения активности NOS в цельной крови и тромбоцитах крысы, чем *in vitro* у человека; под действием CH1 уровень NO, продуцируемого в нейтрофилах человека, повышался, в то время как у крыс он был несколько снижен по сравнению с контролем. Введение CaM в реакционную смесь совместно с CH1 снижало почти вдвое активность NOS нейтрофилов человека с демонстрацией противоположно-

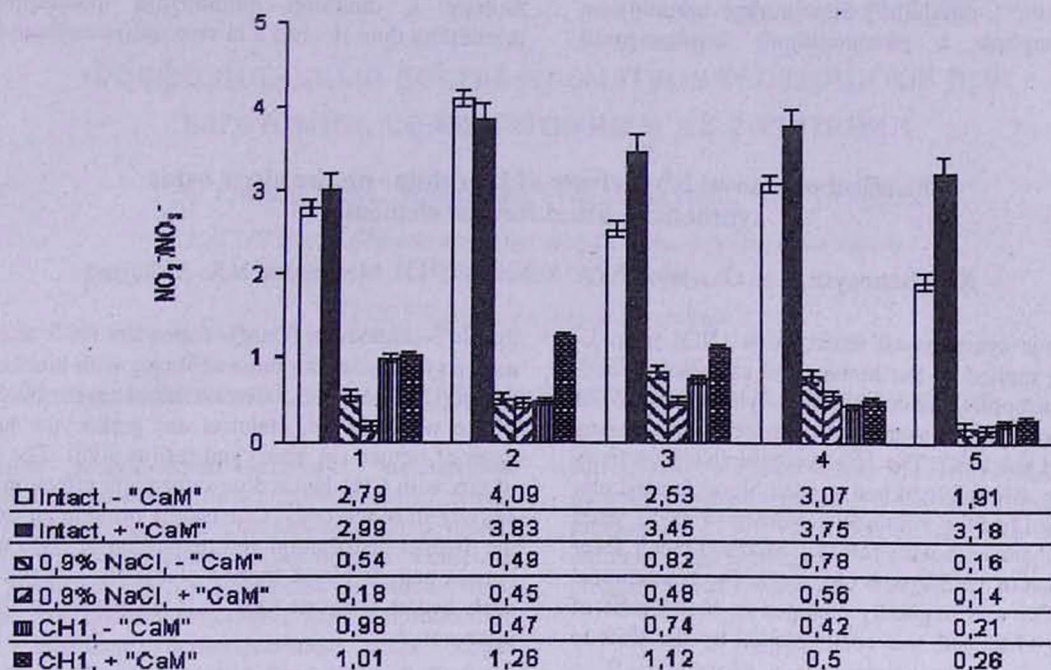


Рис.2. Влияние in vivo N^G -производного L-аргинина (CH1) (3мг/кг) на синтез NO в форменных элементах и цельной крови крыс. По оси абсцисс: 1 – кровь; 2 – тромбоциты; 3 – нейтрофилы; 4 – лимфоциты; 5 – моноциты. По оси ординат: нитрит-нитрат анионы (мкг/мл крови), время инкубации – 24 ч.

го эффекта в нейтрофилах крыс после инъекций CH1, при этом активность NOS в цельной крови и тромбоцитах крыс стимулировалась в гораздо большей степени (5,7 и 2,8 раза), чем у человека (1,7 и 1,2 раза).

Необходимы дальнейшие исследования по выявлению особенностей биохимического паттерна активности NOS в тромбоцитах и иммунокомпетентных клетках крови человека и крысы, ибо их необходимо учи-

тывать при использовании грызунов в качестве модели при изучении патологических процессов, а также при скрининге лекарственных препаратов. Выявленное нами избирательное действие вновь синтезированного аналога L-аргинина на активность NOS в клетках крови человека в норме и при ПБ также требует дополнительного изучения для использования его в терапевтических целях.

Поступила 29.08.03

L-аргинин и его N^G - производный аргинин на активность NOS в клетках крови человека и крысы

Г.А. Авансеев, У.С. Галайков, Г.А. Галайков, Л.С. Мухоморов, Л.В. Мухоморова

Аргинин (ARG) и его N^G - производный аргинин (CH1) стимулируют синтез NO в клетках крови человека и крысы. В исследовании участвовали 10 здоровых добровольцев (5 мужчин и 5 женщин) и 10 крыс. В крови человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина. В тромбоцитах человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина. В нейтрофилах человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина. В лимфоцитах человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина. В моноцитах человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина.

аргинин (ARG) и его N^G - производный аргинин (CH1) стимулируют синтез NO в клетках крови человека и крысы. В исследовании участвовали 10 здоровых добровольцев (5 мужчин и 5 женщин) и 10 крыс. В крови человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина. В тромбоцитах человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина. В нейтрофилах человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина. В лимфоцитах человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина. В моноцитах человека и крысы были измерены концентрации нитрит-нитрат анионов (NO₂-NO₃-) и аргинина.

ակտիվությունը: L-արգինինի նորաստեղծ ածանցյալը (CH1) ցուցաբերել է ընտրողական ազդեցություն

մարդու և առնետի վերոհիշյալ կենսաքիմիական պատկերի վրա in vitro և in vivo պայմաններում:

The effect of a novel N^α-derivate of L-arginine on the nitric oxide synthesis in blood formed elements

K.A. Barseghyan, S.H. Ghazaryan, G.A. Kevorkian, N.H. Movsesyan, N.K. Alchujyan

Endogenous synthesis of nitric oxide (NO) from L-arginine was studied in the human and rat whole blood, platelets, neutrophils, monocytes and lymphocytes. The NO production was measured via nitrogen oxides assay (diazotization reaction). The NO synthase (NOS) activity differed in the whole blood and studied blood formed elements (BFE) of healthy volunteers (women of 38-51 years old, n=3) and patients with familial Mediterranean fever (FMF) (women of 16-50 years old, n=4). The biochemical pattern of NOS was markedly changed in blood cells of patients with FMF and was accompanied by the shift to

the Ca²⁺-calmodulin (CaM)- dependent NOS activity. The newly synthesized arginine analogue with blocked α-NH₂ group (CH1) exerted a diverse effect on the NOS activity of the whole blood, platelets and leukocytes subpopulations of human (in vitro) and rat (in vivo). The treatment of rats with CH1 had a dose-dependent effect on the NOS activity in blood cells. Our results provide an example of the distinct distribution and regulation of NOS activity in human and rat blood formed elements. The selectivity of such action suggests that it is amenable to therapeutic intervention.

Литература

1. Оганесян З.Р., Айрапетян А.С., Шахсуварян Г.Р. и др. Мед. наука Армении, 2002, 42, 2, с. 47.
2. Проскуряков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Иммунология, 2000, 4, с. 9.
3. Серая И.П., Нарциссов Я.Р. Успехи совр.биол., 2002, 122, с. 249.
4. Фрик Г.,Прейснер З.С., Иенсен Г.Л., Бурмейстер Ю. Иммунологические методы (под ред. Х.Фримеля). М.,1979, с. 518.
5. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Biochem J., 2001, 357, p. 593.
6. Esh T., Stefano G.B., Fricchione G.L.,Benson H. Med. Sci. Monit., 2002, 8, p. 103.
7. Gagnon C., Leblond F.A., Filep J.G. FEBS Lett., 1998, 431, p. 107..
8. Geller D.A., Lowenstein C.J., Shapiro R.A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, p. 3491.
9. Hickey M.J. Clin. Science, 2000, 100, p. 1.
10. Hrabak A., Bajor T., Temesi A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, 198, p. 206.
11. Licinio J., Prolo P., McCann S.M., Wong M. Mol.Med., 1999, 5, 5, p. 225.
12. McBride A., Brown G.C. FEBS Lett., 1997, 417, p. 231.
13. Pryor W.A., Gueto R., Jin X., Koppenol W.H., Uppu R.M. Free Radl.Med., 1995, 18, p. 75.
14. Tracey W.R., Linden J., Peach M.J., Johns R.A. J. Farm. Exp.Ther., 1989, 252, p. 922.
15. Vallance P. Nitric Oxide (R.J. Gryglewski, P. Minuz, Eds.), 2001, IOS Press, Amsterdam-Paris-London.