

УДК 577.3

О ВОЗМОЖНОСТИ РЕГУЛИРОВАНИЯ ПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА В ЛЕЙКОЦИТАХ И МАКРОФАГАХ

Т.Т. Жумабаева, Ж.Т. Молдалиев, Е.Г. Наглер, Л.М. Байдер, З.В. Куроптева

Проведено исследование влияния хлорида аммония и цитруллина на образование NO в клетках печени и в перитонеальных макрофагах. Отмечена возможность использования клеткой цитруллина для синтеза в начале аргинина, а затем обратно для синтеза NO и цитруллина, поскольку процесс синтеза представляет собой замкнутый цикл, и клетки печени и макрофаги самостоятельно могут обеспечивать себя аргинином.

Ключевые слова: оксид азота; цитруллин; аргинин; макрофаги; иммунитет; лейкоциты; NO-синтазы; изоформы.

THE POSSIBILITY OF REGULATION OF PRODUCTION OF THE NITROGEN OXIDE IN LEUKOCYTES AND MACROPHAGES

T.T. Zhumabaeva, J.T. Moldaliev, E.G. Nagler, L.M. Bayder, Z.V. Kuropteva

Influence research of chloride ammonium and cytrulline on formation NO in cells of a liver and in peritoneal macrophages is considered. It is maybe used by a cell for synthesis in the beginning arginine, and then once again for synthesis NO and cytrulline as process of synthesis represents the closed cycle is noted, both cells of a liver and macrophages can independently provide themselves arginine.

Keywords: nitrogen oxide; citrulline; arginine; macrophages; immunity; leukocytes; NO-syntases; isoforms.

Актуальность. Состояние клеточного (врожденного) иммунитета определяется функциональной активностью клеток иммунной системы – лейкоцитов и тканевых макрофагов. Известно, что после перенесенных длительных стрессовых ситуаций, при многих патологических состояниях и фармакологических воздействиях, хронических заболеваниях, а также с возрастом иммунитет человека снижается. Причем показано, что количество лейкоцитов и макрофагов не уменьшается, а снижается функциональная активность этих клеток, в результате чего они не могут в полной мере осуществлять свои функции. Попытки стимулировать МФ для борьбы с инфекцией с использованием иммуноактивных цитокинов и ряда других соединений не принесли ожидаемых результатов. Выполненные нами в последние годы исследования позволили понять причину, почему это происходит.

В настоящее время уже определенно установлено, что цитотоксическое действие клеток иммунной системы – лейкоцитов и макрофагов – обусловлено, главным образом, оксидом азота (NO), который вырабатывается этими клетками по известному аргининзависимому пути с участием индуцируемой NO-синтазы (iNOS).

Известно, что NO синтезируется в клетках из L-аргинина и кислорода с участием специальных ферментов – NO-синтаз.

В настоящее время наиболее известны 3 изоформы этого фермента: 2 конститутивные – это эндотелиальная и нейрональная NO-синтазы (eNOS и nNOS, соответственно) и индуцируемая (iNOS). Первые 2 синтазы оксида азота eNOS и nNOS обычно активируются повышением Ca^{2+} в цитозоле, что стимулирует выделение NO в течение нескольких минут. Они синтезируют небольшие количества NO – до десятков микромолей [1, 2].

Материалы и методы.

Препараты. Были использованы хлорид аммония, цитруллин и аргинин фирмы АКРОС (США), а также рекомбинантный гамма-интерферон – “гаммаферон” фирмы “Фермент”, (Россия).

Использовали изолированную печень мышей линии SHK. После декапитации животных выделяли печень, измельчали ее на мелкие кусочки и добавляли физиологический раствор. Приготовленную смесь делили на три части. К одной части (1) добавляли вначале гамма-интерферон в дозе 100 МЕ, затем через 30 мин добавляли хлорид аммония и цитруллин (концентрация препаратов $2 \times 10^{-3} M$), вторую часть (2) инкубировали только

с гамма-интерфероном. Третью часть (3) использовали в качестве контроля – без всяких добавок инкубировали при комнатной температуре при тех же условиях, что 1 и 2. Через 3 ч и 19 ч кусочками печени заполняли тefлоновые трубочки, замораживали все при температуре жидкого азота, затем вытаскивали содержимое из трубочек, получались образцы для измерения в виде столбиков диаметром 3 мм и высотой 30 мм.

Перитонеальные макрофаги выделяли стандартным способом вымывания содержимого брюшной полости мышей линии SHK 0,9%-ным раствором NaCl [3]. Собранные клетки дважды промывали тем же раствором и центрифугировали при 250 г в течение 10 мин. Осадок суспендировали в физрастворе. Использовали концентрацию клеток не менее 10^8 в 1 мл раствора. Для питания клеток добавляли 2%-ный р-р сыворотки крупного рогатого скота (КРС). Суспензию макрофагов делили на три части. К первой части добавляли вначале гамма-интерферон, затем через 30 мин – хлорид аммония и цитруллин (концентрация препаратов 10^{-3} М). Вторую часть инкубировали только с гамма-интерфероном (100 МЕ), третью использовали в качестве контроля – без добавок. Инкубировали при комнатной температуре. В качестве ловушки оксида азота использовали чистый Hb (10^{-5} М) или Hb эритроцитов. Во втором случае ко всем частям суспензии было добавлено по 25 мкл свежeweделенной гепаринизированной цельной крови. Через 20 и 40 ч после начала инкубации были приготовлены образцы суспензии макрофагов, замороженные при температуре жидкого азота, в виде столбиков диаметром 3 мм и высотой 30 мм.

Спектры ЭПР приготовленных образцов регистрировали на спектрометре ESP-300 фирмы “Bruker-Analitishe-Messtechnik” (Германия) при температуре жидкого азота.

Результаты и обсуждение. Как мы уже отмечали выше, при функционировании индуцируемого фермента iNOS в течение длительного времени синтезируется значительное количество NO, что требует и большого количества аргинина, поскольку на образование одной молекулы NO расходуется 1 молекула аргинина. Для выяснения возможностей обеспечения аргинином клеток, которые способны экспрессировать iNOS и продуцировать оксид азота в течение длительного времени, были проведены следующие опыты.

Брали ткани печени и инкубировали их с гамма-интерфероном. Ткани печени удобны для проводимого исследования, во-первых потому, что в печени функционирует цикл мочевины, в котором синтезируется аргинин, и, во-вторых, что практически все её клетки (гепатоциты, а также

клетки Купфера, Ито и эндотелиальные) обладают способностью индуцировать iNOS и синтезировать NO [1], что предполагает и высокий расход аргинина.

Далее нами было исследовано влияние хлорида аммония и цитруллина на образование NO в клетках печени. Клетки печени вначале стимулировали гамма-интерфероном, а затем добавляли хлорид аммония и цитруллин и следили за образованием оксида азота. На рисунке 1 показаны спектры ЭПР образцов печени, инкубированных при комнатной температуре, с добавлением гамма-интерферона, хлорида аммония и цитруллина (рисунок 1.1) и с добавлением только гамма-интерферона (рисунок 1.2). В спектрах ЭПР образцов печени, инкубированных в присутствии гамма-интерферона, хлорида аммония и цитруллина (рисунок 1.3), регистрируется сигнал с триплетным расщеплением при $g = 2,01$ комплексов гемсодержащих белков с оксидом азота Гем-NO, полученный при вычитании спектра 2 из спектра 1.

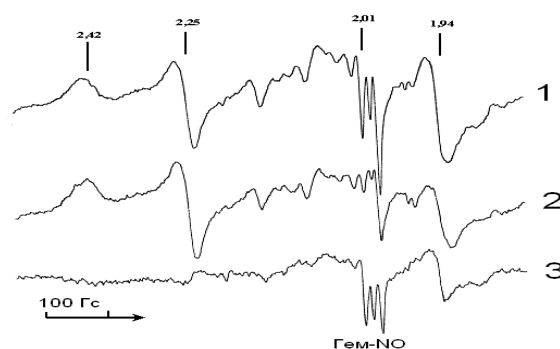


Рисунок 1 – Спектры ЭПР образцов печени, инкубированных при комнатной температуре с гамма-интерфероном, хлоридом аммония и цитруллином (1), с гамма-интерфероном (2) и разностный спектр ЭПР (3), полученный при вычитании спектра 2 из спектра 1

Появление комплексов Гем-NO в спектрах на рисунке 1.1 указывает, что в образцах печени, клетки которой были предварительно активированы гамма-интерфероном, в присутствии хлорида аммония и цитруллина образуется дополнительное количество оксида азота. Этот опыт показал, что появившийся в исследуемой системе цитруллин напрямую может быть использован для синтеза аргинина и NO.

Используя полученные данные, логично было предположить, что поскольку при работе iNOS наряду с NO образуется цитруллин, следовательно, он может быть использован вновь для синтеза аргинина.

Поскольку аргинин в цикле мочевины синтезируется из цитруллина с использованием источ-

ника азота, и приведенные выше данные показали возможность существования малого цикла синтеза аргинина и NO в тканях печени, была проверена возможность существования самостоятельного цикла синтеза аргинина и NO в макрофагах.

Исследовали влияние хлорида аммония и цитруллина на образование NO в перитонеальных макрофагах. Для этого вначале стимулировали перитонеальные МФ гамма-интерфероном, а затем добавляли хлорид аммония и цитруллин и следили за образованием оксида азота клетками. В качестве ловушки NO использовали Hb эритроцитов, добавленный к суспензии перитонеальных макрофагов в виде цельной крови. Гемовые группы Hb, как мы уже отмечали выше, являются эффективными ловушками образующегося в клетках оксида азота. Изучая особенности образования NO клетками иммунной системы, в которых функционирует индуцируемая NO-синтаза (iNOS), мы попытались выяснить, каким образом эти клетки обеспечивают продукцию высоких количеств оксида азота

На рисунке 2 показана предполагаемая схема цикла синтеза аргинина и оксида азота в перитонеальных макрофагах.

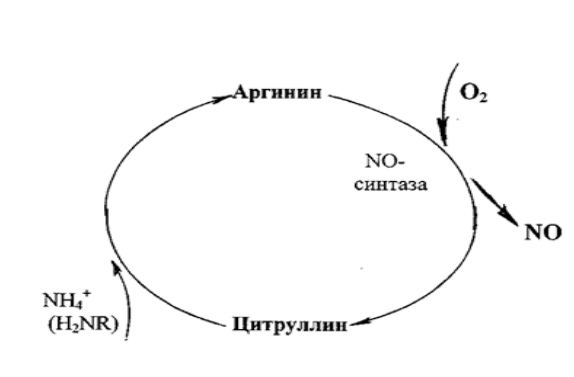


Рисунок 2 – Предполагаемая схема цикла синтеза аргинина и оксида азота в перитонеальных макрофагах

На рисунке 3 показаны спектры ЭПР образцов суспензии макрофагов, инкубированных при комнатной температуре в течение 40 ч, с добавлением гамма-интерферона, хлорида аммония и цитруллина (рисунок 3.1) и с добавлением только интерферона (рисунок 3.2). В спектрах ЭПР образцов макрофагов, инкубированных в присутствии гамма-интерферона, хлорида аммония и цитруллина (рисунок 3.1), регистрируется сигнал, который накладываются два сигнала: сигнал g – фактором 2,01 и сигнал нитрозильных комплексов гемоглобина с оксидом азота Гем-NO.

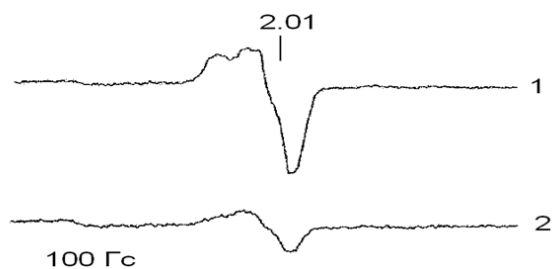


Рисунок 3 – Спектры ЭПР суспензии перитонеальных макрофагов после 40 часов инкубации при комнатной температуре: 1 – в присутствии гамма-интерферона, цитруллина и хлорида аммония; 2 – в присутствии гамма-интерферона. Условия регистрации спектров те же, что и на рисунке 1

Методом ЭПР было исследовано образование NO в макрофагах и тканях печени при инкубации с аргинином и показано, что количество продуцируемого клетками NO ограничивается недостатком субстрата аргинина, а не способностью NO-синтезирующего фермента (iNOS). При инкубации клеток печени с цитруллином и хлоридом аммония также наблюдалось увеличение синтеза NO (см. рисунок 1).

Из этого следует, что образующийся при синтезе оксида азота из аргинина второй продукт цитруллин, считавшийся побочным продуктом, может быть использован клеткой для синтеза вначале аргинина, а затем снова для синтеза NO и цитруллина. Это говорит о том, что процесс синтеза NO из аргинина не является линейным, а представляет собой замкнутый цикл, в котором образующийся побочный продукт цитруллин вновь используется для синтеза аргинина и NO. Макрофаги, таким образом, самостоятельно могут обеспечивать себя аргинином.

Следует только обеспечить необходимыми кофакторами работу NO-синтазы, для нормального функционирования которой требуется помимо субстрата аргинина также кислород и 6 кофакторов, среди которых – тетрагидробиоптерин и НАДФН. При истощении запасов соединений, обеспечивающих работу этой молекулярной машины – индуцируемой NO-синтазы, снижается выработка NO и цитотоксическое действие лейкоцитов и макрофагов. Это приводит к снижению функциональной активности лейкоцитов и макрофагов и их цитотоксического действия на патогенные организмы [4]. Поэтому возможность повышения продукции оксида азота (NO) в клетках иммунной системы имеет важное значение для повышения эффективности профилактики и терапии инфекционных заболеваний.

Литература

1. Тэйлор Б.С. Биохимия / Б.С. Тэйлор, Л.Х. Аларсон, Т.Р. Биллиар. М., 1998. 63. Вып. 7. С. 901–922.
2. Vodovotz Y., Kwon N.S., Pospischil M., Manning J., Paik J., Nathan C. // J. Immunol. 1994. 152, 4110–4118.
3. Новые методы культуры животных тканей / ред. Восли Г.Д. М.: Мир, 1976.
4. Байдер Л.М., Алещенко А.В., Куроптева З.В. Докл. РАН, 2005. С. 405.