

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.152.1:616.155.34-091.818:612.015.36:546.172.6

©Коллектив авторов

### РОЛЬ ИНДУКЦИИ И ИНГИБИРОВАНИЯ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ДИСБАЛАНСА

**Н.В. Рязанцева<sup>1</sup>, Т.В. Жаворонок<sup>2\*</sup>, Е.А. Степовая<sup>2</sup>, Ю.В. Стариков<sup>1</sup>, В.А. Бычков<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Кафедра фундаментальных основ клинической медицины, <sup>2</sup>кафедра биохимии и молекулярной биологии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию”; 634050, Томск, Московский тракт, 2;  
тел/факс: 8(3822)420922, 8(3822)533309, эл. почта: volveren\_x@ngs.ru

При моделировании окислительного стресса *in vitro* с 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> показана протекторная роль оксида азота в реализации конституционального апоптоза нейтрофилов крови. Выявлены закономерности влияния индуктора NO-синтаз L-аргинина и ингибитора синтеза оксида азота L-NAME на количество аннексин-положительных клеток, содержание белка Вах, активных форм кислорода, циклических нуклеотидов и кальциевый гомеостаз в нейтрофилах при реализации запрограммированной гибели в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении. При окислительном стрессе L-аргинин нормализует повышенный внутриклеточный уровень Ca<sup>2+</sup> и соотношение cAMP/cGMP за счёт увеличения уровня cGMP, стабилизируя метаболизм и продлевая жизнь нейтрофилов. В условиях острого воспаления индукции NO недостаточно для ограничения выхода Ca<sup>2+</sup> в цитозоль и появления антиапоптотического эффекта; блокада синтеза NO усугубляет ситуацию, активируя апоптоз нейтрофилов за счёт резкого увеличения содержания Ca<sup>2+</sup> и снижения количества циклических нуклеотидов в цитозоле. Протекторное влияние NO на апоптоз нейтрофилов при окислительном дисбалансе не связано с регуляцией проапоптотического белка Вах.

**Ключевые слова:** оксид азота, апоптоз, нейтрофилы, активные формы кислорода, окислительный стресс, циклические нуклеотиды.

**ВВЕДЕНИЕ.** Жизнедеятельность нейтрофилов в норме и при патологии сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК), среди которых одной из важнейших является радикал NO. Именно нейтрофилы в очаге острого воспаления (ОВ) определяют мощность потока активных форм кислорода и азота, производимых с целью нейтрализации флогогена, но при этом создают ситуацию окислительного стресса (ОС) в окружающих тканях [1–3]. Высокая окислительная нагрузка дестабилизирует редокс-баланс в самих нейтрофильных гранулоцитах и включает танатогенную программу. Удаление нейтрофилов путем апоптоза

\* - адресат для переписки

считается основным механизмом, который разрешает исход ОВ, устанавливая баланс между оптимальным функционированием эффекторных клеток и их безопасной элиминацией [3]. Избыточное накопление в клетке АФК непосредственно индуцирует митохондриальный путь реализации апоптоза, когда сильные окислители повреждают митохондриальную мембрану и выходящие в цитозоль танатогенные факторы запускают каскад реакций саморазрушения [4, 5]. АФК способствуют вовлечению в процесс программированной гибели клетки рецептор-опосредованных путей, влияя на экспрессию белков-регуляторов и транскрипционных факторов [6].

Оксид азота в этих условиях выступает, с одной стороны, компонентом ОС, с другой, – важнейшим медиатором клеточного метаболизма. Универсальность механизмов апоптоза и окислительного стресса предполагает участие NO и в индукции, и в регуляции программированного саморазрушения. Как самый стабильный из свободных радикалов, NO является нетипичной сигнальной молекулой с высокой реакционной способностью, включается в сигнальную трансдукцию и отвечает за широкий диапазон функций. В разных ситуациях NO может проявлять как проапоптотические, так и антиапоптотические свойства [7–10]. В связи с этим представляется актуальным выяснение роли NO в механизмах реализации апоптотической гибели нейтрофилов в условиях дисбаланса окислительного метаболизма.

**МЕТОДИКА.** Материалом для исследования служила венозная кровь, полученная у 32 здоровых доноров-добровольцев (18 мужчин и 14 женщин) в возрасте от 18 до 40 лет ( $25,0 \pm 5,4$ ) и 54 пациентов с острыми воспалительными заболеваниями (30 мужчин и 24 женщины) в возрасте от 18 до 50 лет ( $32,0 \pm 3,0$ ), из них 29 больных внебольничной пневмонией и 25 – острым аппендицитом, поступивших в стационар в порядке скорой медицинской помощи. Кровь забирали после подписания информированного согласия пациентов, используя стандартные вакуумные системы BD VACUTAINER™ с гепарином лития. Нейтрофильные лейкоциты выделяли в стерильных условиях методом градиентного центрифугирования на двойном градиенте плотности Ficoll-Paque ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ) (“GE Healthcare”) и фиколл-урографин ( $1,095 \text{ г/см}^3$ ) (фиколл – “GE Healthcare”; урографин – “Шеринг”, Россия). Суспензию нейтрофилов трижды отмывали в среде RPMI-1640 (“Вектор-Бест”, Россия), стандартизовали количество клеток до  $2 \cdot 10^6$  в 1 мл среды. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5% трипановым синим (“Serva”, США) составляла 95%. Выделенные клетки культивировали в течение 18 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в 96-луночных планшетах с полной питательной средой RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Биолот”, Россия), инактивированной при 56°C в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина, 2 мМ/мл HEPES (“Flow”, Великобритания). Для индукции ОС в культуры клеток добавляли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в конечной концентрации 5 мМ. Клетки культивировали в течение 18 ч при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для изучения молекулярных механизмов участия NO в регуляции апоптоза нейтрофилов при ОС *in vitro* в среду инкубации совместно с 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> добавляли субстратный ингибитор NO-синтаз L-NAME (N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинин метиловый эфир) (“Fluka”, США) или индуктор синтеза NO L-аргинин (“MP Biomedicals”, США) в конечных концентрациях 500 мкМ.

Методом лазерной проточной цитометрии с использованием цитометра Epics XL (“Beckman Coulter”, Франция) оценивали число аннексин-положительных клеток в культуре, содержание АФК и ионов Ca<sup>2+</sup> в нейтрофилах. Оценку раннего апоптоза нейтрофилов проводили путем регистрации экспрессии на внешней поверхности клеточной мембраны фосфатидилсерина с помощью FITC-меченного аннексина V (“Caltag”, США) [11]. Результат выражали в % клеток, вступивших в апоптоз. В цитоплазме нейтрофилов определяли содержание АФК с использованием красителя с заблокированной флуоресценцией – дихлорфлуоресцеин диацетата (“Sigma Aldrich”, США) [12],

ионов кальция – методом, основанным на оценке интенсивности флуоресценции липофильного зонда Fluo 3 AM (“MP Biomedicals”) [13], связывающего  $\text{Ca}^{2+}$ . В обоих случаях результат выражали в усл. ед. (интенсивность свечения на клетку), равных отношению интенсивности флуоресценции соответственно дихлорфлуоресцеин диацетата или Fluo 3 AM к общему числу клеток.

Определение содержания циклических нуклеотидов (сAMP и сGMP) в нейтрофилах проводили методом твердофазного радиоиммунного анализа, основанным на реакции антигена с антителом, в ходе которой развивается конкуренция между мечеными антигенами и антигенами исследуемой пробы за адсорбированные на стенке пробирки антитела. В работе были использованы наборы “RIA AMPc/сAMP” и “RIA сGMP” (“Immunotech”, Франция).

Содержание метаболитов NO в культуральной среде определяли методом, основанным на цветной реакции с реактивом Грисса (1% сульфаниламид (“MP Biomedicals”) и 0,1% нафтилендиамин (“MP Biomedicals”, США), разведённые в 12% уксусной кислоте) [14], для восстановления имеющихся в среде нитрат-ионов до нитрит-ионов использовали омеднённый кадмиевый редуктор. Результаты выражали в мкМ, используя для построения калибровочной кривой  $\text{NaNO}_2$  в диапазоне концентраций от 0 до 150 мкМ.

С помощью метода вестерн-блоттинга в нейтрофилах определяли содержание белков Bax и Bcl-2. Клеточные экстракты получали путем лизиса клеток в фосфатно-солевом буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl буфер (pH=6,5), 100 мМ дитиотреитол, 2% SDS, 0,1% бромфеноловый синий, 15% глицерол (“Helikon”, США), смесь протеазных ингибиторов (“Sigma”, США). Белки разделяли по молекулярной массе под действием электрического поля в течение 60 мин при напряжении поля 120 В [15]. Для последующего исследования белки электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”, США) в течение 90 мин при силе тока 60 мА по методу [16]. В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфатдегидрогеназу как белок, кодируемый геном “домашнего хозяйства” (антитела фирмы “Chemicon”, США), выражая содержание определяемого белка как отношение его сигнала к сигналу белка глицеро-3-фосфатдегидрогеназы.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Данные представлены в таблицах в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей ( $Q_1$ - $Q_3$ ). Оценку нормальности распределения полученных результатов проводили с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий средних величин оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Наличие связи между изучаемыми показателями проводили с использованием корреляционного анализа по методу Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Проведено сравнительное исследование вклада NO в развитие программированной гибели нейтрофилов на фоне окислительного дисбаланса, возникающего при остром воспалении, и экспериментальной модели ОС, предполагающей культивирование клеток здоровых доноров в присутствии 5 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В обоих случаях в культурах нейтрофилов регистрировалось равнозначное увеличение внутриклеточной концентрации АФК, количества аннексин-положительных клеток (табл. 1 и 2). АФК способны индуцировать деградацию митохондриальной мембраны с образованием гигантских пор пермеабилizационного перехода и выходом в цитозоль цитохрома с, других индукторов смерти (Smac/DIABLO, AIF, эндонуклеазы G),  $\text{Ca}^{2+}$  и запускать митохондриальный путь программированной гибели клеток [5,17]. Необратимость вступления нейтрофилов в апоптоз при ОС *in vitro* и ОВ подтверждалась ростом экспрессии белка Bax (рисунок), участвующего в открытии гигантских пор в мембране митохондрии [18], и отсутствием экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2, способного предотвращать формирование таких пор [17].

# ОКСИД АЗОТА И АПОПТОЗ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Таблица 1. Влияние L-аргинина и L-NAME на внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода (АФК), количество нейтрофилов в стадии раннего апоптоза, содержание метаболитов NO в среде инкубации нейтрофилов крови здоровых доноров при окислительном стрессе *in vitro* и пациентов с острым воспалением, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>).

Группы обследованных лиц (условия эксперимента <i>in vitro</i> с нейтрофилами крови)		АФК, усл.ед. (интенсивность свечения на клетку)	Аннексин- положительные клетки, %	Метаболиты NO в среде инкубации, мкмоль/л
Здоровые доноры	Интактные нейтрофилы (контроль), n = 32	0,240 (0,214 – 0,259)	49,25 (45,03 – 58,13)	0,108 (0,106 – 0,110)
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 мМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , n = 32	0,678 (0,596 – 0,705) p <sub>1</sub> <0,05	61,10 (57,80 – 67,50) p <sub>1</sub> <0,05	0,121 (0,120 – 0,132) p <sub>1</sub> <0,05
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 мМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 500 мкМ L-аргинином, n = 22	0,676 (0,656 – 0,700) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05	54,90 (47,10 – 60,25) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,05	0,142 (0,140 – 0,146) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 мМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 500 мкМ L-NAME, n = 22	0,740 (0,720 – 0,751) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	61,90 (59,75 – 64,05) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05	0,109 (0,106 – 0,110) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,05
Больные острыми воспалительными заболеваниями	Интактные нейтрофилы, n = 54	0,579 (0,557–0,664) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05	61,75 (56,93–65,80) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05	0,157 (0,153–0,161) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
	Нейтрофилы, инкубированные с 500 мкМ L-аргинином, n = 54	0,585 (0,563–0,667) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05 p <sub>4</sub> <0,05	60,50 (54,75–65,50) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05 p <sub>4</sub> >0,05	0,171 (0,164–0,179) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>4</sub> <0,05
	Нейтрофилы, инкубированные с 500 мкМ L-NAME, n = 54	0,585 (0,566–0,644) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05 p <sub>5</sub> >0,05	71,30 (65,50–74,40) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>5</sub> <0,05	0,147 (0,140–0,148) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>5</sub> <0,05

Примечание (здесь и в таблице 2): p<sub>1</sub> - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в культуре интактных нейтрофилов крови здоровых лиц;  
p<sub>2</sub> - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в культуре нейтрофилов, полученных у здоровых лиц и инкубируемых в присутствии 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;  
p<sub>3</sub> - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в культуре нейтрофилов, полученных у больных острыми воспалительными заболеваниями;  
p<sub>4</sub> - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в культуре нейтрофилов, полученных у здоровых лиц и инкубируемых в присутствии L-аргинина;  
p<sub>5</sub> - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в культуре нейтрофилов, полученных у здоровых лиц и инкубируемых в присутствии L-NAME.



Таблица 2. Влияние L-аргинина и L-NAME на внутриклеточную концентрацию циклических нуклеотидов, ионов кальция в культурах нейтрофилов крови здоровых доноров при окислительном стрессе *in vitro* и пациентов с острым воспалением, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>).

Группы обследованных лиц (условия эксперимента <i>in vitro</i> с нейтрофилами крови)		cAMP нмоль/10 <sup>6</sup> кл	cGMP нмоль/10 <sup>6</sup> кл	Ионы Ca <sup>2+</sup> , усл.ед. (интенсивность свечения на клетку)
Здоровые доноры	Интактные нейтрофилы (контроль), n = 32	114,13 (101,96 – 120,55)	12,25 (10,48 – 17,04)	0,220 (0,114 – 0,234)
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , n = 32	134,97 (117,36 – 139,39) p <sub>1</sub> <0,05	4,16 (3,91 – 7,88) p <sub>1</sub> <0,05	0,444 (0,403 – 0,489) p <sub>1</sub> <0,05
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 500 мкМ L-аргинином, n = 22	102,13 (92,73 – 116,12) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	12,46 (9,64 – 17,20) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,05	0,193 (0,178 – 0,214) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,05
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 500 мкМ L-NAME, n = 22	76,74 (67,01 – 83,61) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	4,46 (2,18 – 6,35) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05	0,384 (0,365 – 0,403) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
Больные острым воспалительным заболеванием	Интактные нейтрофилы, n = 14	88,58 (67,42–121,71) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	4,06 (3,48–5,79) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05	0,231 (0,211–0,263) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,05
	Нейтрофилы, инкубированные с 500 мкМ L-аргинином, n = 16	89,99 (77,44–100,82) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> >0,05 p <sub>4</sub> >0,05	9,28 (7,62–12,51) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>4</sub> >0,05	0,378 (0,349–0,390) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>4</sub> <0,05
	Нейтрофилы, инкубированные с 500 мкМ L-NAME, n = 17	62,11 (55,52–75,46) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>5</sub> <0,05	2,55 (1,30–4,28) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>5</sub> <0,05	0,419 (0,393–0,433) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>5</sub> <0,05

Изучение концентрации стабильных метаболитов NO в среде инкубации нейтрофилов показало, что формирование ОС сопровождалось увеличением наработки оксида азота (p<0,05), но в ещё большей мере это происходило при ОВ (p<0,05) (табл. 1). Вероятно, более активная продукция NO эффекторными клетками в условиях ОВ, необходима для потенцирования не только сосудистого и регуляторного влияния оксида азота, но и его микробицидных эффектов. Пероксид водорода способен оказывать прямое стимулирующее влияние на NO-синтазу и ускорять переход L-аргинина в L-цитруллин с повышением содержания внутриклеточного cGMP [19], а увеличение концентрации Ca<sup>2+</sup> в цитозоле нейтрофилов (p<0,05) при ОС (табл. 2) могло привести к дополнительной активации кальций-зависимых NO-синтаз.

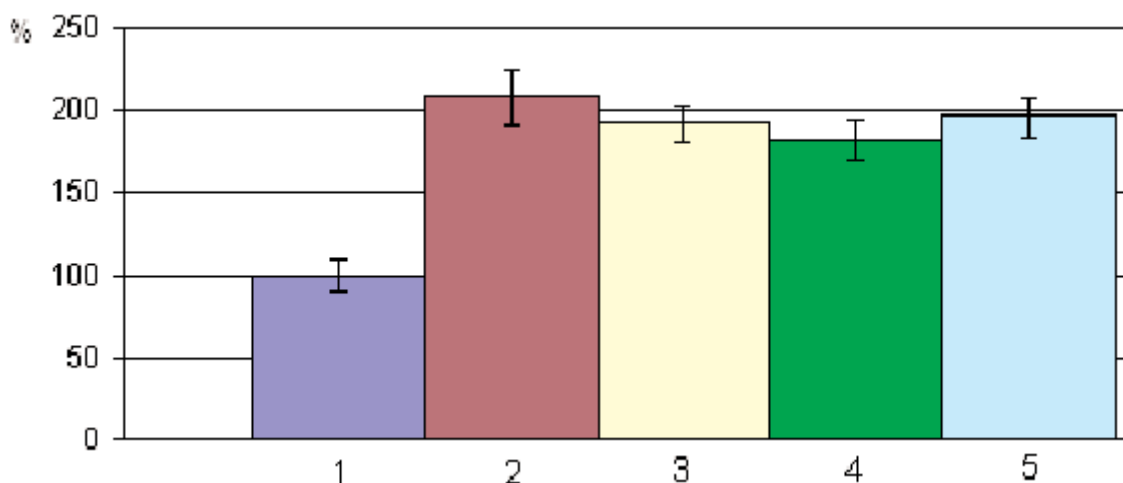


Рисунок.

Содержание белка Вах при регистрации методом вестерн-блоттинга в культурах нейтрофилов, полученных у здоровых доноров - интактная культура (1), культивирование с 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2), культивирование с 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 500 мкМ L-NAME (3), культивирование с 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 500 мкМ L-аргинином (4), а также у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями (5). За 100% принято содержание белка Вах в интактной культуре клеток здоровых доноров, представленное как отношение его сигнала к стандартному сигналу белка глицеро-3-фосфатдегидрогеназы.

В литературе имеются сведения о способности оксида азота предотвращать открытие гигантских пор митохондрии, блокируя тем самым выход в цитоплазму индукторов апоптоза и запуск каспазного каскада [10]. Предположение о стабилизирующем влиянии оксида азота на развитие апоптоза нейтрофилов подтверждалось в нашем исследовании существованием обратной корреляционной зависимости между числом аннексин-положительных клеток и концентрацией метаболитов NO в культурах нейтрофилов здоровых доноров при воздействии 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $r = -0,83$ ,  $p < 0,05$ ).

Для выяснения роли NO в регуляции программированной клеточной гибели в среду инкубации нейтрофилов добавляли L-аргинин (приоритетный субстрат NO-синтазы) или L-NAME (конкурентный ингибитор NO-синтазы). При экспериментальном ОС L-аргинин, вызывая прирост уровня метаболитов NO в среде инкубации, снижал процент аннексин-положительных клеток ( $p < 0,05$ ), хотя не влиял на содержание АФК в цитозоле нейтрофилов ( $p > 0,05$ ). L-NAME в этих условиях снижал содержание метаболитов NO до интактных величин ( $p < 0,05$ ) и повышал уровень внутриклеточных АФК, но не влиял на апоптоз нейтрофилов (табл. 1). Способность L-аргинина подавлять развитие апоптоза, индуцированного действием 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, связана, по всей вероятности, с цитопротекторными эффектами NO, а блокада NO-синтазы L-NAME отменяла протекторное модулирующее влияние оксида азота на генерацию митохондриями АФК, активирующих программу клеточной гибели.

В условиях ОБ индукция синтеза NO уже не влияла на апоптоз нейтрофилов ( $p > 0,05$ ), а блокада NO-синтазы увеличивала количество аннексин-положительных клеток ( $p < 0,05$ ), причем в обоих случаях внутриклеточный уровень АФК достоверно не менялся. В острый период воспалительных заболеваний на нейтрофилы наряду с ОС действуют флогены, цитокины и другие регуляторные факторы, что может ограничивать защитное влияние NO на апоптоз эффекторных клеток.

В целом индукция синтеза NO сопровождалась угнетением апоптоза нейтрофилов на фоне окислительного дисбаланса, а ингибирование NO-синтаз способствовало развитию программированной гибели. Исходя из этого, можно сделать предварительное заключение о протекторной роли NO в регуляции апоптоза нейтрофилов в условиях ОС. Однако на основании полученных результатов трудно сделать вывод о том, является ли оксид азота протекторным агентом непосредственно или выступает стимулятором механизмов, защищающих клетку от повреждения и гибели.

Для исследования регуляторной роли NO в каскадных реакциях передачи внутриклеточных сигналов в нейтрофилах при ОС было изучено влияние L-аргинина и L-NAME на концентрацию внутриклеточных мессенджеров (сGMP, сAMP,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Тандем циклических нуклеотидов является универсальной управляющей системой клетки, контролирующей систему кальций-кальмодулин и другие вторичные мессенджеры. Для реализации клеточных эффектов важно не столько изменение концентрации каждого циклического нуклеотида, сколько модификация их соотношения сAMP/сGMP [20]. В качестве мишеней NO в клетке могут выступать ферменты, вовлеченные в метаболизм циклических нуклеотидов, важнейшим из которых является растворимая гуанилатциклаза.

В интактных культурах нейтрофилов соотношение сAMP/сGMP составило 9:1, на фоне ОБ оно возрастало до 22:1 в основном за счет снижения уровня сGMP, при инкубации клеток с 5 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  оно повышалось до 32:1 не только за счет снижения содержания сGMP, но и вследствие увеличения содержания сAMP (табл. 2). Более высокое соотношение циклических нуклеотидов при окислительном дисбалансе в нейтрофилах могло возникнуть под воздействием АФК, в том числе пероксида водорода, способного подавлять активность гемсодержащих белков, к которым относится растворимая гуанилатциклаза [21]. В процессе респираторного взрыва, запускающего апоптоз в ответ на воздействие флогогена, рост соотношения сAMP/сGMP определяет эффективность воспалительного ответа за счет снижения апоптотической реакции нейтрофилов и уменьшения их фагоцитоза [22].

Дополнительная активация NO-синтаз L-аргинином в нейтрофилах при ОС *in vitro* приводила к снижению до контрольных величин ( $p < 0,05$ ) уровня  $\text{Ca}^{2+}$  и соотношения сAMP/сGMP, составившего 8:1 за счет снижения концентрации сAMP и резкого увеличения содержания сGMP. Вероятнее всего, уменьшение количества сAMP в клетке при экспериментальном ОС под действием NO формируется в ответ на повышение концентрации сGMP, что, на наш взгляд, напрямую связано со стимуляцией растворимой гуанилатциклазы оксидом азота. Основным путем предотвращения апоптоза, связанный с NO/сGMP-зависимой активацией протеинкиназы G в клетках, сопровождается подавлением выхода в цитозоль цитохрома c,  $\text{Ca}^{2+}$  [7], снижением активности каспаз [9], а также индукцией фактора NF- $\kappa\text{B}$  и стимуляцией протеинкиназ, фосфорилирующих антиапоптотические белки [10, 21]. Вместе с тем, оксид азота может предотвращать апоптоз по сGMP-независимому механизму, вследствие гиперполяризации мембраны митохондрии за счет стабилизирующего влияния NO на митохондриальный потенциал [23], что ингибирует открытие гигантских пор и выход  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль [8].

Возможно, подавление оксидом азота апоптотической программы нейтрофилов в конечном счете происходило за счет снижения поступления  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий. Это предположение подтверждается наличием обратной корреляционной связи между концентрацией метаболитов NO и концентрацией внутриклеточного кальция при ОС ( $r = -0,79$ ,  $p < 0,05$ ). Однако в условиях ОБ действие субстратного индуктора NO было недостаточным для ограничения увеличенного выхода  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль, и антиапоптотический эффект оксида азота не проявлялся. Блокада синтеза NO усугубляла эту ситуацию, активируя проапоптотические механизмы за счет резкого увеличения концентрации

цитоплазматического кальция на фоне снижения содержания циклических нуклеотидов в сравнении с аналогичными показателями в нейтрофилах пациентов с ОВ ( $p < 0,05$ ). Вероятно, повышение внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов при развитии программированной гибели нейтрофилов носит транзиторный характер, связанный с нормализацией клеточного метаболизма и предотвращением клеточной гибели, а усиление апоптотической реакции приводит к подавлению активации потенциально возможных сAMP/сGMP-зависимых путей выживания клетки.

Следовательно, при ОВ различного генеза резервные ресурсы нейтрофилов для подавления механизма программированной гибели с помощью NO ограничены. По данным [23], сильные стрессорные стимулы, приводя к гиперполяризации мембраны митохондрии и NO-опосредованной задержке выхода в цитозоль апоптоз-индуцирующих факторов, не отменяют апоптотическую программу. В нашем исследовании ни индукция, ни ингибирование синтеза NO не меняли уровень Вах в нейтрофилах при ОС, и во всех группах содержание данного белка оставалось выше аналогичного показателя в интактной культуре клеток здоровых доноров (рисунок). Известно, что синтез Вах находится под контролем редокс-зависимого транскрипционного фактора p53, поэтому полученные данные, скорее всего, свидетельствуют об отсутствии регуляторного влияния NO на транскрипционные механизмы синтеза Вах. Также оксид азота не изменяет функциональные свойства Вах за счет нитрозилирования, что показано для ряда других белков, локализованных на митохондриальных мембранах [24, 25].

Таким образом, при остром воспалении и культивировании нейтрофилов здоровых доноров в присутствии 5 мМ  $H_2O_2$  регистрируется равнозначный рост внутриклеточной концентрации АФК, количества аннексин-положительных клеток и экспрессии белка Вах. Полученные данные указывают на протекторную роль оксида азота в регуляции программы гибели нейтрофилов при окислительном дисбалансе, что не связано с модуляцией синтеза проапоптотического белка Вах. Индукция синтеза NO L-аргинином за счет повышения внутриклеточного уровня сGMP снижает соотношение сAMP/сGMP до значений, близких к контрольным, нормализует внутриклеточный уровень  $Ca^{2+}$  и в результате чего продлевает жизнь клетки при ОС *in vitro*. В условиях ОВ влияния L-аргинина и сопутствующего роста уровня сGMP недостаточно для ограничения выхода в цитозоль  $Ca^{2+}$  и индукции антиапоптотического эффекта, а блокада синтеза NO усугубляет ситуацию, повышая апоптоз нейтрофилов за счет резкого увеличения содержания  $Ca^{2+}$  и снижения количества циклических нуклеотидов в цитоплазме.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" (ГК № 02.740.11.0311, ГК № 02.740.11.5031) и при поддержке РФФИ (гранты 09-04-99026-р\_офи, 09-04-99025-р\_офи).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Е.Е. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 561–581.
2. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. (2006) *Окислительный стресс. Преооксиданты и антиоксиданты*. М. "Слово"
3. Melley D.D., Evans T.W., Quinlan G.J. (2005) *Clinical Science*, **108**, 413–424.
4. Тодоров И.Н. (2007) *Российский химический журнал*, **LI**(1), 93–107.
5. Chen Q., Crosby M., Almasan A. (2003) *Korean J. Biol. Sci.*, **7**(1), 1–9.
6. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю. и др. (2008) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **145**(5), 505–508.
7. Kim Y.M., Kim T.H., Seol D.W. et al. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 31437–31441.
8. Brune B., von Knethen A., Sandau K.B. (1999) *Cell Death Diff.*, **6**, 969–975.



9. *De Nadai C., Sestili P., Cantoni O. et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5480–5485.
10. *Choi B.M., Pae H.O., Jang S., et al.* (2002) *J. Biochem. Molec. Biology*, **35**(1), 116–126.
11. *Van Engeland M., Nieland L.J.W., Ramaekers F.C.S. et al.* (1998) *Cytometry*, **31**, 1–9.
12. *Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R. et al.* (1983) *J. Immunol.* **130**, 1910–1917.
13. *Merritt J.E., Mc Carthy S.A., Davies M.P. et al.* (1990) *J. Biochem.*, **269**, 513–519.
14. *Голиков П.П.* (2004) Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. М. “ИД Медпрактика-М”.
15. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680–685.
16. *Towbin H., Staehelint T., Gordon J.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350–4354.
17. *Tiwari B. S., Belenghi B., Levine A.* (2002) *Plant Physiol.*, **128**(4), 1271–1281.
18. *Mikhailov V., Mikhailova M., Degenhardt K. et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 5367–5376.
19. *Thomas S.R., Chen K., Keaney F.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 6017–6024.
20. *Abdollahi M., Bahreini-Moghadam A., Emami B. et al.* (2003) *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **135**, 331–336.
21. *Hanafy K.A., Krumenacker J.S., Murad F.* (2001) *Med. Sci. Monit.*, **7**, 801–819.
22. *Rossi A.G., Mc Cutcheon J.C., Roy N. et al.* (1998) *J. Immunol.*, **160**, 3562–3568.
23. *Beltran B., Mathur A., Duchon M.R. et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14602–14607.
24. *Alonso D., Encinas J.M., Uttenthal L.O. et al.* (2002) *Neuroscience*, **111**, 47–56.
25. *Daniel P.T., Schulze-Osthoff K., Belka C. et al.* (2003) *Essays Biochem*, **39**, 73–88.

Поступила: 12. 11. 2009.

# THE ROLE OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS INDUCTION AND INHIBITION IN REGULATION OF BLOOD NEUTROPHIL CELL DEATH DURING OXIDATIVE DISBALANCE

*N.V. Ryazantseva<sup>1</sup>, E.A. Stepovaya<sup>2</sup>, T.V. Zhavoronok<sup>2</sup>, Yu.V. Starikov<sup>1</sup>, V.A. Bychkov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Dept. of Fundamental Basics of Clinical Medicine, <sup>2</sup>Dept. of Biochemistry and Molecular Biology,  
Siberian state medical university, Moskovsky tract, 2, Tomsk, 634050 Russia;  
tel./fax: 8(3822)420922, 8(3822)533309; e-mail: tavaza@ngs.ru

Modeling oxidative stress *in vitro* with 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has demonstrated a protective role of nitric oxide on realization of constitutional blood neutrophil cell death. The NO-synthase inductor L-arginine and the inhibitor of nitric oxide synthesis, L-NAME, influenced on the amount of annexin-positive cells, the content of Bax protein, reactive oxygen species, cyclic nucleotides, and calcium homeostasis in neutrophils under conditions realizing programmed death during oxidative stress *in vitro* and under acute inflammation. During oxidative stress L-arginine normalized the increased intracellular Ca<sup>2+</sup> level and the cAMP/cGMP ratio due to increase of cGMP level, stabilized metabolism and prolonged neutrophil life. During acute inflammation NO induction was insufficient for limitation of Ca<sup>2+</sup> release into cytosol and for onset of the apoptotic effect; blockade of NO synthesis deteriorated this situation by activating neutrophil apoptosis due to the sharp increase in Ca<sup>2+</sup> content and reduction of cyclic nucleotides in cytosol. The protective effect of NO on neutrophil cell death during oxidative dysbalance is not associated with regulation of apoptotic protein Bax.

**Key words:** nitric oxide, cell death, neutrophils, ROS, oxidative stress, cyclic nucleotides.