

БИОХИМИЯ

УДК 577.152.199:616-056

Г. В. Элбакян¹, Н. Х. Алчуджян², Н. О. Мовсесян², академик К. Г. Карагезян³

Влияние лечения колхицином на продукцию активных соединений азота форменными элементами крови больных периодической болезнью

(Представлено 15/Х 2007)

Ключевые слова: *аргинин, колхицин, окись азота, периодическая болезнь, синтаза окиси азота, форменные элементы, цитруллин*

Колхициноterapia является наиболее действенным средством борьбы с приступами лихорадки и серозита и развитием амилоидоза у больных периодической болезнью (ПБ) [1]. Альтернативных вариантов лечения ПБ пока нет, тогда как от 15 до 30% ПБ-пациентов резистентны к лечению колхицином. Патогенетические механизмы ПБ ассоциируются с развитием аутоиммунных процессов, связанных с нарушением врожденного иммунитета, в механизмах которого участвует синтаза окиси азота (NOS) [2]. В тромбоцитах и иммунных клетках крови функционируют Ca^{2+} -кальмодулин (CaM)-зависимые нейрональная и эндотелиальная изоформы NOS (cNOS) и Ca^{2+} -CaM-независимая индуцибельная изоформа NOS (iNOS), участвующая в механизмах иммунного ответа и воспалительной реакции организма, экспрессия которой заметно возрастает в ответ на продукцию провоспалительных цитокинов при аутоиммунных, инфекционных и прочих болезнях [3]. Отличия в регуляции и функциях изоформ NOS проявляются при различных патологиях, что используется для избирательной фармакокоррекции в практической медицине. В этой связи нами впервые были изучены дозозависимое влияние колхицина на активность различных изоферментов NOS и уровень метаболитов реакции в форменных элементах (ФЭ) и плазме крови больных ПБ.

Материалы и методы. Было обследовано 6 больных ПБ (трое женщин и трое мужчин) в возрасте 36-55 лет, (средний возраст 46.8 ± 7.14 года). Средняя длительность заболевания составляла 5.5 года Больные получали перорально колхицин (0.5-1 мг/день): до 2-2.5 года — 4 пациента и 10-15 лет — 2 пациента. В период исследования для каждого пациента доза была увеличена вдвое. Кровь собирали из локтевой вены во внеприступный период утром натощак в пробирку с 5% $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ в соотношении 5:1 и выделяли плазму и ФЭ по общепринятому методу [4].

Определение активных соединений азота. В супернатантах проб после предварительного осаждения белков 0.5N NaOH и 10% ZnSO_4 спектрофотометрически определяли концентрацию активных соединений азота (АСА): окислов азота (NO , NO_2^- , NO_3^- , N_2O_4 , N_2O_3) и связанных нитрозосоединений (нитрозотиолы и нитрозамины), неспецифической реакцией диазотирования реактивом Грисс - Илосвая при длине волны 546 нм [5].

Определение активности изоформ NOS. Активность NOS определяли по продукции АСА при долговременной инкубации ФЭ (22 ч при 37°C). Реакцию инициировали добавлением суспензии клеток (10^6 клеток/мл) в реакционную смесь: 20 mM HEPES буфер, содержащий 2 mM дитиотреитол, 3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4, в который в зависимости от условий опыта вводили 1.15 mM EDTA или 1.73 mM CaCl_2 , 5.25 mM L-аргинин (субстрат NOS) и кофакторы NOS: 0.126 mM NADPH, 20.07 мкМ (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина, 6.08 мкМ FAD, 5.53 мкМ FMN. Активность iNOS определяли в присутствии 1.15 mM EDTA в инкубационной среде, общую активность NOS — в присутствии 1.73 mM CaCl_2 ; cNOS — по разности между общей активностью NOS и iNOS и выражали в нмоль (NO_2^-)/мг белка/22 ч. Концентрацию белка оценивали по методу Лоури [6].

Определение L-аргинина и L-цитруллина. Концентрацию L-аргинина определяли методом [7], L-цитруллина — используя набор Био-Ла-тест (La Chema, Чехия).

Достоверность различий средних значений параметров по группам оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Удвоенная доза колхицина, снижающая выраженность и частоту приступов больных ПБ, заметно повышала уровень АСА, т. е. NO и его производных, во всех субпопуляциях лейкоцитов (нейтрофилы, моноциты, лимфоциты) с одновременным снижением его в тромбоцитах и плазме больных ПБ (рис. 1). Повышенный уровень АСА в субпопуляциях лейкоцитов коррелировал с продукцией ими АСА при долговременной инкубации (рис. 2). При этом образование АСА в исследуемых клетках является в основном результатом действия изоферментов NOS, что под-

тверждается корреляцией (корреляционный коэффициент Пирсона, r) между уровнем нитритов и аргинина ($r = 0.676$, $P < 0.001$) и уровнем нитритов и цитрулина ($r = 0.703$, $P < 0.001$) в ФЭ, а также дополнительной продукцией ими АСА при введении в реакционную смесь L-аргинина и кофакторов NOS.

Изучение продукции АСА клетками крови за счет эндогенных ресурсов, т.е. без дополнительного введения в инкубационную среду L-аргинина и кофакторов NOS, показало, что активность iNOS в ряду нейтрофилы-лимфоциты-моноциты-тромбоциты составляла 2.1 ± 0.04 ; 0.97 ± 0.01 ; 0.87 ± 0.002 ; 0.22 ± 0.009 нмоль (NO_2^-)/мг белка/22 ч, соответственно, $P \leq 0.05$. Параллельно клетки инкубировали без ЭДТА в присутствии ионов кальция (в отсутствие субстрата и кофакторов NOS). В этом случае продукция моноцитами АСА возрастала до 1.48 ± 0.046 нмоль (NO_2^-)/мг белка, из которых 0.61 ± 0.048 нмоль (NO_2^-)/мг белка приходилось на долю cNOS, тогда как в остальных ФЭ уровень АСА падал ниже исходного. Известно, что свободный цитозольный кальций стимулирует активность cNOS изоформ, способствуя связыванию CaM с ними, кроме того он стабилизирует iNOS [8]. При ПБ уровень кальция в плазме крови возрастает и его концентрация в клетках варьирует в зависимости от степени его проникновения. По-видимому, в тех ФЭ, где уровень кальция способствует повышенной продукции активных форм кислорода, активно взаимодействующих с NO, имеет место быстрое удаление последней. Так, NO с высокой скоростью взаимодействует с супероксидным радикалом с образованием мощного окислителя – пероксинитрита (ONOO^- , ПН), который продуцируется активированными гранулоцитами, моноцитами и лимфоцитами человека при их долговременной инкубации 4-24 ч [9]. В течение 24 ч активированные нейтрофилы человека способны утилизировать до 3 мкмоль экзогенного NO/млн клеток с образованием ПН [10]. Исходя из вышеизложенного по проявлению активности NOS в ФЭ можно судить об интенсивности образования в них свободных радикалов; как видно из рис. 1, в тромбоцитах и нейтрофилах она высока. Примечательно, что через месяц лечения удвоенной дозой колхицина во всех этих клетках при инкубации в присутствии кальция (без L-аргинина и кофакторов NOS) выявлялась активность NOS, что опосредованно свидетельствует о подавлении свободнорадикальных процессов. При этом активность cNOS лимфоцитов равнялась 0.6 ± 0.08 , тромбоцитов – 1.76 ± 0.065 , нейтрофилов – 2.06 ± 0.023 , моноцитов – 5.57 ± 0.44 нмоль (NO_2^-)/мг белка/22 ч, $P \leq 0.05$. В ряду нейтрофилы-лимфоциты-тромбоциты возрастала активность iNOS (2.26 ± 0.07 ; 1.02 ± 0.05 ; 0.77 ± 0.004 нмоль (NO_2^-)/мг белка/22 ч, соответственно, $P \leq 0.05$), с полным подавлением ее в моноцитах, что, возможно, обусловлено преимущественным ингибированием iNOS в условиях

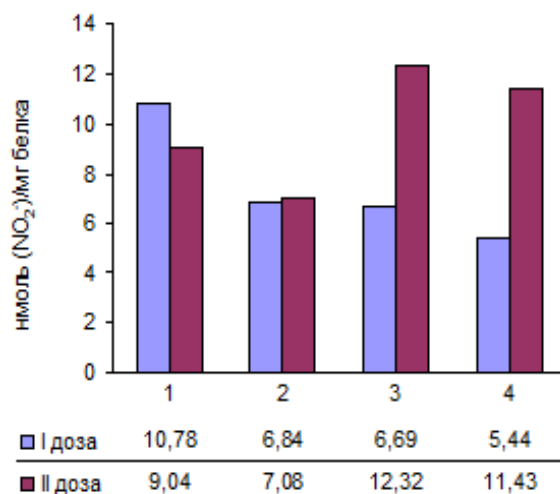


Рис. 1. Сдвиги в уровне активных соединений азота в ФЭ крови больных ПБ при месячном лечении удвоенной дозой колхицина: 1 – тромбоциты; 2 – нейтрофилы; 3 – моноциты; 4 – лимфоциты.

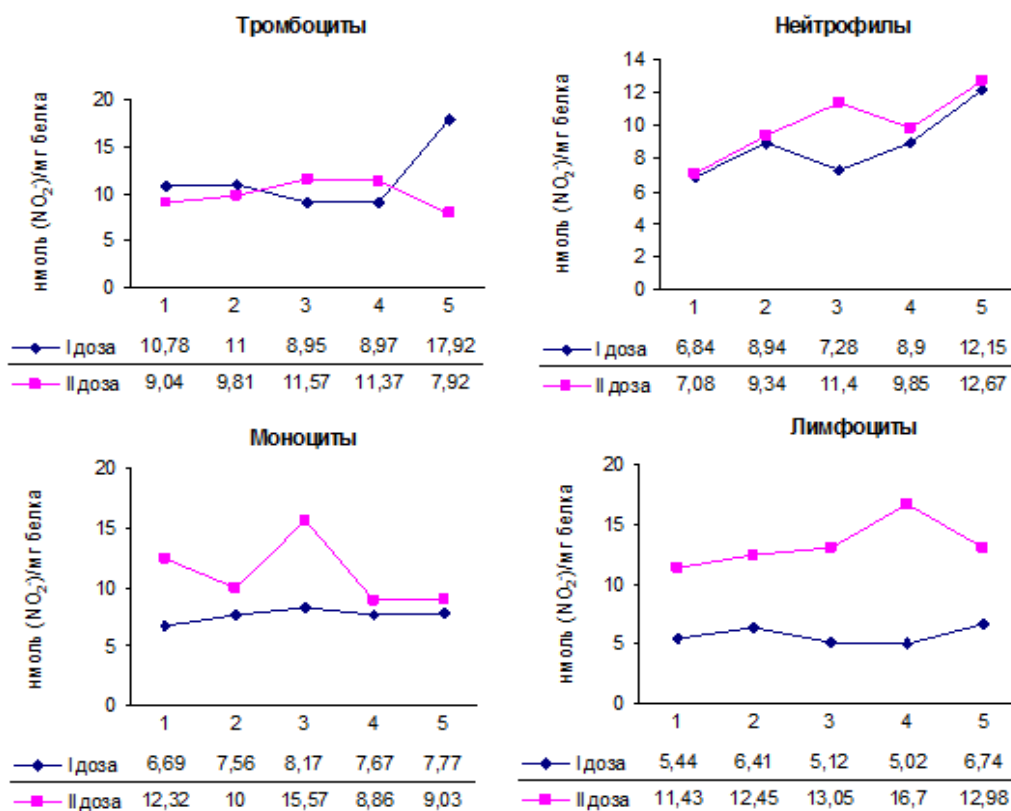


Рис. 2. Продукция *in vitro* активных соединений азота (АСА) форменными элементами крови больных ПБ при лечении колхицином: 1 – исходный уровень АСА; уровень АСА после 22 ч инкубации ФЭ: 2 – с ЭДТА; 3 – с кальцием; 4 – с ЭДТА, субстратом и кофакторами NOS; 5 – с кальцием, субстратом и кофакторами NOS.

гиперпродукции NO со стороны cNOS [8]. Общая продукция АСА изоформами NOS в тромбоцитах возрастала от 0.22 до 2.53, нейтрофилах – от 2.1 до 4.32, моноцитах – от 1.48 до 5.57 и лимфоцитах – от 0.97 до 1.62 нмоль (NO_2^-)/мг белка/22 ч, $P \leq 0.05$.

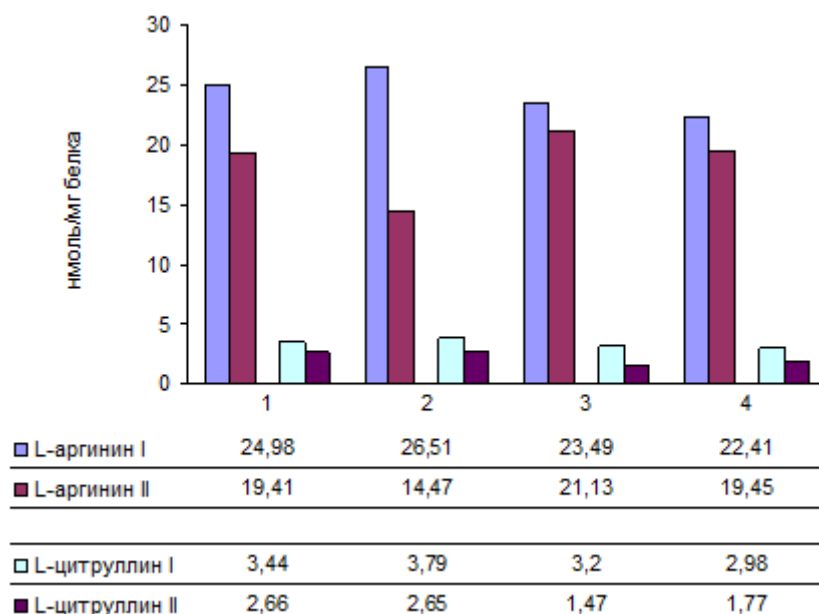


Рис. 3. Сдвиги в уровне аргинина и цитруллина в ФЭ крови больных ПБ при лечении удвоенной дозой колхицина: 1 – тромбоциты; 2 – нейтрофилы; 3 – моноциты; 4 – лимфоциты.

Низкие концентрации доноров NO (нитропрусида натрия) (10-100 нмоль/л) усиливают свободнорадикальный ответ в нейтрофилах крыс, а высокие (10 мкмоль/л) ингибируют его [11]; не исключено, что подобное действие NO может оказывать и в организме человека. Повышение продукции NO иммунными клетками крови и лимфоидных органов в процессе воспаления обусловлено индукцией iNOS, стимулирующей механизмы иммунной супрессии [12]. Колхицин также проявляет иммуномодулирующее действие, стимулируя иммуносупрессивные свойства конканавалинаА-обработанных мононуклеаров крови детей, больных ПБ [13]. Лечение колхицином в сочетании с интерфероном- γ , стимулирующим активность NOS, эффективно подавляет экспрессию гена MEFV, ассоциированного с ПБ [14].

При инкубировании ФЭ в присутствии L-аргинина и кофакторов NOS картина менялась: в присутствии кальция выявлялась активность изоформ cNOS, которая была выше, чем iNOS (за исключением моноцитов), составляя в тромбоцитах 8.95 ± 1.04 , нейтрофилах – 3.25 ± 0.98 , лимфоцитах – 1.72 ± 0.64 , моноцитах – 0.1 ± 0.007 нмоль (NO_2^-)/мг белка, $P \leq 0.05$, одновременно подавляя iNOS, что, возможно, обусловлено ретроингибированием высокими концентрациями NO, ибо только в моноцитах, где уровень NO был значительно ниже, активность iNOS не подавлялась и составляла 0.98 нмоль

(NO₂⁻)/мг белка. После лечения удвоенной дозой колхицина введение L-аргинина и кофакторов NOS стимулировало изоформы NOS нейтрофилов, повышало активность iNOS тромбоцитов и лимфоцитов, не влияя или снижая в них активность sNOS, и подавляло все изоформы NOS в моноцитах, что свидетельствует о насыщении фермента субстратом и о том, что дальнейшее добавление субстрата ингибирует его в той или иной степени в зависимости от изоферментного спектра NOS в ФЭ, чем и обусловлены наблюдаемые различия во влиянии L-аргинина и кофакторов NOS. Это подтверждается и снижением концентрации аргинина и цитрулина в ФЭ и плазме крови больных ПБ (рис. 3), сопровождающимся общим повышением активности NOS ФЭ. При этом наблюдалось снижение уровня АСА в плазме, что, вероятно, обусловлено активным взаимодействием NO с гемоглобином, концентрация которого значительно увеличивается во внеприступный период в плазме больных ПБ при колхицинотерапии [15]. Уровень цитрулина в плазме больных ПБ во внеприступный период в среднем превышал в 3.2 раза таковой у здоровых людей сходного возраста. Повышение содержания цитрулина снижает поглощение аргинина иммунными клетками, что может отразиться на функционировании и взаиморегуляции аргининметаболизирующих систем, включая изоформы NOS.

Таким образом, изучение дозозависимого влияния колхицина на энзиматическую продукцию активных соединений азота и уровень метаболитов реакции NOS показало, что терапевтическое действие колхицина в определенной степени опосредуется системой NOS/NO, которая подвергается изменениям при ПБ, и ее коррекция может стать одним из альтернативных вариантов лечения ПБ.

¹НИИ курортологии и физической медицины МЗ РА

²Институт биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА

³Институт молекулярной биологии НАН РА

Г. В. Элбакян, Н. Х. Алчуджян, Н. О. Мовсесян, академик К. Г. Карагезян

**Влияние лечения колхицином на продукцию активных соединений азота
форменными элементами крови больных периодической болезнью**

Лечение в течение месяца удвоенной дозой колхицина больных периодической болезнью (ПБ) показало, что терапевтическое действие колхицина сопровождается положительными сдвигами в активности изоферментов синтазы окиси азота.

Коррекция этих метаболических сдвигов при ПБ может стать новым подходом в терапии ПБ.

Գ. Ո. Էլբակյան, Ն. Խ. Ալչուջյան, Ն. Ն. Մովսեսյան, ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյոզյան
Կոլխիցինով բուժման ազդեցությունը պարբերական հիվանդությամբ հիվանդների
արյան ձևավոր փարբերի կողմից արտադրվող ազոտի ակտիվ միացությունների վրա

Մեկ ամսվա բուժման ընթացքում կոլխիցինի կրկնակի բանակով պարբերական հիվանդությամբ (ՊՏ) փառասպող հիվանդների մոտ դրական թերապևտիկ ազդեցությունը գուցորդվում էր ազոտի օքսիդի սինթազի իզոֆերմենտների ակտիվության զգալի խթանմամբ: Նյութափոխանակության այդ օղակում շեղումների կորեկցիան ՊՏ ժամանակ կարող է նոր մոտեցում հանդիսանալ ՊՏ բուժման գործում:

G. V. Elbakyan, N. Kh. Alchujyan, N. H. Movsesyan, academician K. G. Karageusian
Effect of Colchicine Therapy on Reactive Nitrogen Species Production by Blood Formed
Elements of Patients with Familial Mediterranean Fever

We have revealed that therapeutic effect of the two-fold increase in the dosage of colchicine is associated with remarkable changes in the activity of the nitric oxide synthase isoenzymes of blood formed elements of patients with familial Mediterranean fever (FMF). Thus, the correction of the observed metabolic changes may become a new therapeutic tool in FMF treatment.

Литература

1. *Medlej-Hashim M., Loiselet J., Lefranc G., Megarbane A.* - Sante. 2004. V. 14. N 4. P. 261-266.
2. *Bogdan C.* - Nature Immunol. 2001. V. 2. P. 907-916.
3. *Esh T., Stefano G.B., Fricchione G.L., Benson H.* - Med. Sci. Monit. 2002. V. 8. N 6. P. 103-118.
4. *Фрик Г., Прейснер З.С., Иенсен Г.Л., Бурмейстер Ю.* В кн.: Иммунологические методы (под ред. Х. Фримеля). М. Мир. 1979. 372 с.
5. *Tracey W.R., Linden J., Peach M.J., Johns R.A.* - J. Farm. Exp. Ther. 1989. V. 252. N 3. P. 922-928.
6. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* - J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
7. *Akamatsy S., Watanabe T.J.* - J. Biochem. 1961. V. 77. N 3. P. 484.

8. *Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.* - Biochem J. 2001. V. 357. N 3. P. 593-615.
9. *Gagnon C., Leblond F.A., Filep J.G.* - FEBS Lett. 1998. V. 431. N 1. P. 107-110.
10. *McBride A., Brown G.C.* - FEBS Lett. 1997. V. 417. N 2. P. 231-234.
11. *Sethi S., Singh M.P., Dikshit M.* - Blood. 1999. V. 93. N 1. P. 333-340.
12. *Shi F.D., Flodstrom M., Kim S.H.* - J. Immunol. 2001. V. 167. P. 3000-3006.
13. *Shlesinger M., Ilfeld D., Handzel Z.T., Altman Y., Trainin N.* - Clin. Exp. Immunol. 1983. V. 54. N 1. P. 73-79.
14. *Kastner D.L., Aksentijevich I.* In: *Koopman W.J., Moreland L.W.*, eds. *Arthritis and Allied Conditions* (15th ed). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2005. P. 1411-1461.
15. *Ozcakar Z.B., Yalcinkaya F., Yuksel S., Acar B., Ekim M.* - Clin. Rheumatol. 2006. V. 25. N 2. P. 149-152.