

ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА L-АРГИНИНА В МАКРОФАГАХ МЫШЕЙ

ГУ НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Резюме

В данной работе было изучено влияние экзогенной и эндогенной перекиси водорода на особенности метаболизма L-аргинина в макрофагах мышей. Физиологические концентрации (10 нМ — 1 мкМ) экзогенной перекиси водорода увеличивают продукцию оксида азота, по-видимому, за счет активации редокс-чувствительных внутриклеточных сигнальных путей, не влияя на активность аргиназы. Эндогенная продукция перекиси водорода, основным источником которой в макрофагах являются супероксид-генерирующие системы, поддерживает физиологический уровень аргиназной активности, а снижение внутриклеточной концентрации H_2O_2 каталазой приводит к ингибированию аргиназы и, соответственно, увеличению продукции оксида азота. Полученные данные позволяют предположить важную роль эндогенных АКМ-генерирующих систем в регуляции метаболизма L-аргинина в макрофагах.

В современной иммунологии сформировалась концепция, предусматривающая взаимосвязь Th1/Th2-баланса в иммунной системе с метаболическим состоянием антиген-презентирующих клеток, оказывающих директивное влияние на дифференцировку Т-лимфоцитов [3]. Убедительно показано, что активация макрофагов может осуществляться различным образом, приводя к появлению либо М1- (классически активированные макрофаги), либо М2-клеток (альтернативно активированные макрофаги), которые отличаются рядом биохимических, функциональных и фенотипических параметров и оказывают оппозитное влияние на Th1/Th2-девиацию иммунного ответа [1]. Презентация антигена Th1-лимфоцитам сопровождается индукцией гена iNOS в макрофагах [8], а синтезируемый ими при этом оксид азота способствует дифференцировке наивных лимфоцитов в Т-хелперы первого типа [6]. Высокая активность аргиназы в альтернативно активированных макрофагах приводит к высокому уровню продукции полиаминов и L-пролина, стимулирующих гуморальный (Th2-зависимый) иммунный ответ, процессы репарации тканей и фиброгенез [4]. Состояние окислительного стресса, приводящее к снижению содержания эндогенных антиоксидантов в антиген-презентирующих клетках, способствует Th2-поляризации иммунного ответа [5]. Однако взаимосвязь ферментативных систем, обеспечивающих внутриклеточную продукцию активных форм кислорода (прежде всего супероксидного радикала и перекиси водорода), с вариантами активации макрофагов практически не изучена.

Целью данной работы было изучение влияния перекиси водорода на особенности метаболизма L-аргинина в макрофагах мышей *in vitro*.

Материалы и методы

Выделение и культивирование макрофагов. Резидентные перитонеальные макрофаги интактных мышей (C57Bl/6xDBA/2) F1 выделяли стандартным способом и культивировали в 96-луночных планшетах в концентрации 200×10^3 клеток на лунку с использованием культуральной среды RPMI-1640, содержащей 10% FCS, 15 мМ Нерес и 0,3% L-глутамина. Для активации NO-синтазы в начале культивирования добавляли LPS (*E. Coli* B5:055) в концентрации 10 мкг/мл. Исследуемые соединения добавляли к макрофагам в начале культивирования однократно в концентрациях 10 нМ, 100 нМ и 1 мкМ (для перекиси водорода) и 50 ЕД/мл и 100 ЕД/мл (для каталазы).

Производство оксида азота оценивали по содержанию нитритов в супернатанте клеточных культур после 48 часов культивирования макрофагов.

Активность аргиназы определяли после 24 часов культивирования макрофагов по скорости образования мочевины из экзогенного L-аргинина.

Статистическую обработку проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Обнаружено, что добавление к макрофагам экзогенной перекиси водорода в концентрации 100 нМ, приводящее к кратковременному возрастанию ее внутриклеточной концентрации, увеличивает LPS-стимулированную продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами, хотя другие концентрации H_2O_2 на синтез NO не влияют. Вполне вероятно, что данный эффект обусловлен непродолжительным увеличением внутриклеточного содержания перекиси водорода, что сопровождается активацией редокс-чувствительных сигнальных путей, регулирующих экспрессию NO-синтазы и, соответственно, увеличивает продукцию оксида азота. В наших экспериментах H_2O_2 была не способна активировать макрофагальную аргиназу без дополнительной стимуляции клеток LPS. В то же время, по литературным данным, экзогенная H_2O_2 увеличивает *in vitro* аргиназную активность в клетках интимы сосудов за счет увеличения экспрессии гена Arg I [7]. Однако этот эффект проявляется только при концентрации перекиси, равной 200 мкМ, что сильно превосходит ее физиологические концентрации в тканях.

Каталаза *in vitro* обладает выраженной способностью усиливать продукцию оксида азота. Этот эффект отмечается при добавлении 50 ЕД/мл каталазы (при этом продукция NO возрастает на 82%) и усиливается с увеличением дозы фермента. На активность аргиназы добавление каталазы оказывает противоположное влияние, дозозависимо снижая ее до 68% от контроля (при дозе каталазы 100 ЕД/мл).

Следовательно, эндогенная продукция перекиси водорода в макрофагах поддерживает определенный физиологический уровень аргиназной активности. Снижение внутриклеточной концентрации H_2O_2 за счет ускорения ее каталитического разложения приводит к угнетению активности аргиназы. С данным эффектом может быть связано резкое увеличение продукции оксида азота, вызываемое каталазой *in vitro*. Согласно литературным данным, ингибирование NAD(P)H-оксидазы апоцинином (в фагоцитах основным источником H_2O_2 служит супероксидный радикал) также приводит к снижению активности аргиназы и содержания ее mRNA в альвеолярных макрофагах [Matthiesen S., et al, 2008].

В наших экспериментах добавление экзогенной перекиси водорода, вследствие ее быстрой инактивации соответствующими эндогенными ферментативными системами, не приводит к изменению активности аргиназы в макрофагах, тогда как более длительное изменение внутриклеточной концентрации H_2O_2 , в случае добавления к клеткам экзогенной каталазы, оказывает выраженное влияние на аргиназу.

Таким образом, продукция активных форм кислорода оказывает существенное влияние на NO-синтазный и аргиназный пути метаболизма L-аргинина в макрофагах. Окислительный стресс, сопровождающийся накоплением активных форм кислорода в клетке, может приводить к изменению физиологического баланса между NO-синтазой и аргиназой в сторону преобладания

активности последней, что характерно для альтернативно активированных макрофагов. Напротив, активация антиоксидантных клеточных систем способствует увеличению продукции оксида азота, что свойственно макрофагам, активированным по классическому пути.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M.* // *Front Biosci.* — 2008. — Vol. 13. — P. 453 — 461.
2. *Matthiesen S., Lindemann D., Warnken M. et al.* // *Eur. J. Pharmacol.* — 2008. — Vol. 579 (1 — 3). — P. 403 — 410.
3. *Mills C., Kincaid K., Alt J.M., et al.* // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164 (12). — P. 6166 — 6173.
4. *Morris S.M.Jr.* // *J. Nutrition.* — 2007. — Vol. 137. — P. 1602 — 1609.
5. *Murata Y., Shimamura T. and Hamuro J.* // *Int. Immunology.* — 2002. — Vol. 14 (2). — P. 201 — 212.
6. *Niedbala W., Wei X.Q., Piedrafita D. et al.* // *Eur. J. Immunol.* — 1999. — Vol. 29. — P. 2498 — 2505.
7. *Thengchaisri N., Hein T.W., Wang W., et al.* // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2006. — Vol. 26 (9). — P. 2035 — 2042.

8. *Van der Veen R.C., Dietlin T.A., Pen L. et al.* // *Cell. Immunol.* 2000. — Vol. 206 (2). — P. 125 — 135.

Tkachev V.O., Volsky N.N.

HYDROGEN PEROXIDE IN L-ARGININE METABOLISM REGULATION IN MURINE MACROPHAGES

In current work was investigated exogenous and endogenous hydrogen peroxide influence on the L-arginine metabolism properties in murine macrophages. Physiological concentrations of exogenous H₂O₂ (10 nM — 1 μM) increase nitric oxide production, probably, by redox-sensitive intracellular signaling pathways activation. Endogenous production of hydrogen peroxide, which main source in macrophages is superoxide-generating enzymatic systems, support physiological arginase activity rate. Catalase-dependent decline of intracellular hydrogen peroxide concentration leads to arginase inhibition and, respectively, enhance nitric oxide production. This data allow to suppose the important role of endogenous ROS-generating systems in L-arginine metabolism regulation in macrophages.