

М.Е. Барінова, В.М. Єльський, Е.Ф. Барінов, О.М. Сулаєва

Функціональна активність моноцитів і механізми внутрішньоклітинної регуляції індукцибельної NO-синтази в динаміці ранового процесу

Вивчали закономірності і механізми регуляції активності індукцибельної NO-синтази (iNOS) в моноцитах-макрофагах у динаміці ранового процесу. Роль внутрішньоклітинних сигнальних систем у модуляції активності iNOS моноцитів периферичної крові 22 хворих з травматичними ранами кінцівок аналізували методом інгібіторного аналізу in vitro. Показано, що з 1-ї до 3-4-ї доби ранового процесу підвищується базальна й стимульована ліпополісахаридом продукція оксиду азоту, активність 5-ліпооксигенази та фосфодіестерази. Активність циклооксигенази та протеїнкінази C зростали через 3 доби, сягали максимуму через 7-10 діб під час формування грануляцій та епітелізації ранової поверхні. Активність протеїнкінази A, що пригнічувала iNOS, зростала з 7-10-ї доби з максимумом через 14 діб, що супроводжувалося активацією аргінази-1. Отже, моніторинг стану різних ланок системи внутрішньоклітинної сигналізації може використовуватися для діагностики й корекції перебігу ранового процесу.
Ключові слова: рановий процес, моноцити-макрофаги, індукцибельна NO-синтаза.

ВСТУП

Характер і виразність запалення, його фазність і результат визначаються комбінацією клітинних елементів, їхнім кількісним відношенням і функціональною активністю [9, 11]. Класичними регуляторами ранового процесу вважаються макрофаги [8, 16]. Останні є продуцентами широкого спектра цитокінів, хемокінів, активних радикалів кисню, бактерицидних білків, модуляторів об'єму та хімічного складу міжклітинної речовини [6, 14]. Значимість цих фактів для з'ясування механізмів аутохронності ранового процесу складно переоцінити, проте до сьогодні не вдалося наблизитися до з'ясування причин і механізмів розвитку хронічних ран і порушення загоєння дефектів шкіри й слизових оболонок [9, 16, 17]. Попередні морфологічні та імуноцитохімічні дослідження ран шкіри викликали низку питань щодо структурно-функціонального стану саме макрофагів, які

контролюють фазність перебігу ранового процесу [3, 11]. Враховуючи недостатню інформативність цитологічних досліджень «відбитків» ранової поверхні з позиції аналізу механізмів забезпечення біологічних ефектів макрофагів, доцільною є оцінка метаболізму клітин-попередників – тобто моноцитів периферичної крові, тим більше, що в них детерміновані шляхи та механізми реалізації сигналів з рецепторів до системних регуляторів [2, 13, 24]. Використаний з цією метою метод інгібіторного аналізу активності клітин in vitro дає змогу змоделювати стан моноцитів-макрофагів у рані. Крім того, такий підхід за умов порушення перебігу ранового процесу (хронічні рани, синдром діабетичної стопи), дає можливість встановити провідні патогенетичні механізми функціональної недостатності моноцитів-макрофагів у кожному окремому випадку, спрогнозувати їх відповідь на модуляцію різних

© М.Е. Барінова, В.М. Єльський, Е.Ф. Барінов, О.М. Сулаєва

сигнальних систем і розробити цілеспрямовані шляхи корекції як функції клітин, так і ранового процесу в цілому [2, 10, 13]. Відомо, що продукція NO внаслідок активації індукцибельної NO-синтази (iNOS) у різних клітинах є провідним механізмом розвитку запалення та наступної репарації рани, а гіперактивність або пригнічення iNOS моноцитів-макрофагів асоційоване з дизрегенерацією ран [2, 15]. Аналіз причинно-наслідкових відносин у зміні активності iNOS ускладнюється широким спектром індукторів ферменту, який включає ліпополісахарид (ЛПС), інтерферон γ , прозапальні цитокіни, комплемент, імуноглобуліни [4, 11, 20]. Відомо, що експресія iNOS стимулюється за умов індукції оксидативного стресу під впливом брадикініну та серотоніну, активації ангіотензинових й адренорецепторів тощо [1, 9]. Однак остаточною відповідь моноцитів-макрофагів на регулятори визначається не тільки їх спектром і чутливістю рецепторів, але й станом сигнальних систем (зокрема, серин-треонінових кіназ, фосфодіестераз), вмістом Ca^{2+} та співвідношенням метаболітів арахідонової кислоти (АК) [6, 23]. Встановлено, що АК та її метаболіти можуть впливати на активність фосфоліпази С [8, 16], аденілатциклази [6], гуанілатциклази [10, 14] та вміст Ca^{2+} [12]. В свою чергу, активація протеїнкінази С (ПкС) індукує вивільнення та метаболізм АК у різних популяціях моноцитів-макрофагів [18, 21]. Важлива роль цАМФ і протеїнкінази А (ПкА) доведена в регуляції проліферації й секреції, скорочення й мембранного транспорту, нейротрансмісії тощо [9, 16]. Було встановлено, що вплив на внутрішньоклітинний вміст цАМФ характерний для деяких гормонів і медіаторів [5, 17]. Слід підкреслити, що сигнальні системи індукують різні морфогенетичні процеси під час гоєння рани [16]. Так, судинна реакція на ушкодження та інфільтрація лейкоцитами визначається індукцією метаболізму АК; зокрема, баланс між різними її метаболічними

шляхами детермінує виразність оксидативного стресу, адгезію, міграцію та фагоцитарну активність нейтрофілів і моноцитів-макрофагів [6, 18, 22]. Активацію ПкС за фізіологічних умов пов'язують з інтенсивністю запальної інфільтрації рани моноцитами-макрофагами, процесами ангиогенезу й формування грануляційної тканини, проліферації та міграції кератиноцитів, а за умов патології – з розвитком ангиопатії та порушенням імунологічної реактивності [21]. Продукція компонентів міжклітинної речовини та фібрилогенез спряжені з активацією ПкА, яка контролює функціональну активність фібробластів і опосередковано через ендотеліальну NO-синтазу (eNOS) забезпечує відновлення функціонального стану ендотелію та ангиогенез [9, 17]. Оскільки вазотропні ефекти NO на протеїнкіназу G є цГМФ-залежними, то важливо проаналізувати лімітуючу ланку вмісту циклічних нуклеотидів – активність фосфодіестераз (ФДЕ) [15, 19]. На жаль, у літературі недостатньо фактів щодо відносин перерахованих елементів сигнальних систем з iNOS, яка по суті відображає прозапальну активацію моноцитів-макрофагів [10, 15]. В інтерпретації цього зв'язку також слід враховувати реципрокність взаємин – з одного боку, фазність ранового процесу залежить від функціонального стану макрофагів, а з іншого – фенотип моноцитів при їх трансформації в макрофаги визначається мікрооточенням у самій рані. Останнє детерміноване не тільки ефективністю запально-репаративного процесу, але загальною реакцією організму на ушкодження [2, 3, 12, 13].

Мета нашого дослідження полягала у встановленні деяких закономірностей та механізмів регуляції активності iNOS моноцитів у різні фази ранового процесу.

МЕТОДИКА

Проаналізовано результати перебігу ранового процесу у 22 умовно здорових пацієн-

тів із травмами кінцівок віком від 30 до 48 років. Хворі обстежені при надходженні в стаціонар, через 3–4 доби, 7–10 і 14–18 днів після госпіталізації. Клітини виділяли з периферичної крові методом градієнтного центрифугування (Histopaque, $\rho = 1,077$ г/см³). Моноцити відмивали забуференим ізотонічним розчином NaCl і ресуспендували у безсироваткому культуральному середовищі RPMI-1640 (ICN). Останнє містило 80 мкг/мл гентаміцину, 2 ммоль/л L-глутаміну та 10 ммоль/л NEPES. Прилипи до пластику клітини виділяли після 3 год інкубації в лунковому планшеті («Flow Lab») з використанням CO₂-інкубатора [2]. Супернатант видаляли, лунки промивали два рази безсироватковим середовищем RPMI-1640. Клітини з розрахунку 10⁶ на лунку поміщали в 96-лунковий планшет у 200 мкл середовища RPMI-1640 із зазначеними вище добавками й 5%-ю ембріональною телячою сироваткою [5, 13]. В I серії вивчали концентрацію NO в супернатанті моноцитів за такою схемою: у контрольній (1-й лунці) проводили інкубацію моноцитів без додавання будь-яких модулаторів і ЛПС (вихідний рівень), в 2-й лунці клітини стимулювали ЛПС (0,3 мкг/мл; E.coli фірми «Calbiochem», США) [5]. В 3-тій та 4-тій лунці вводили стимулятор і селективний інгібітор iNOS: L-аргінін – 200 ммоль/л й NG-(1-Immunoethyl)lysine (L-NIL) – 30 ммоль/л відповідно. В 5-тій лунку додавали селективний інгібітор аргінази-1 – L-нормпвалін (5 ммоль/л) [20]. Після інкубації протягом 24 год при 37 °C у атмосфері з 5 % CO₂ аналізували продукцію NO макрофагами за накопиченням у культуральному середовищі нітрит-іонів (NO₂⁻). Для цього 100 мкл культурального середовища переносили в лунку 96-лункового планшета та послідовно додавали 100 мкл 1,5%-го розчину сульфоніламідів в 1 N HCl, потім 100 мкл 0,15%-го розчину N-(1-нафтил)етилендіаміну. Інкубацію проводили 15–30 хв при кімнатній температурі й аналізували оптичну густина при 540–570

нм на СФ-56 [5]. У II серії при дослідженні молекулярних механізмів модуляції iNOS клітини попередньо інкубували 30 хв при 37 °C у атмосфері 5 % CO₂ з інгібіторами різних ланок системи внутрішньоклітинної сигналізації у таких стандартних концентраціях: стауроспорин (інгібітор ПкС) – 500 нмоль/л; Н-89 (інгібітор ПкА) – 20 мкмоль/л, нордигідроуретикова кислота (НГДУК, інгібітор 5-ліпоксигенази) – 10 мкмоль/л, індометацин (неселективний інгібітор циклооксигенази) – 10 мкм, теofilін (інгібітор ФДЕ) – 5 мкмоль/л [5, 6, 22]. Потім у лунки додавали ЛПС і продовжували інкубацію моноцитів протягом 24 год, після чого досліджували вміст NO за описаним вище протоколом. У контрольну групу були включені 10 практично здорових чоловіків і жінок. Отримані результати обробляли статистично з використанням параметричних і непараметричних критеріїв у програмі MedStat [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Стандартна доза ЛПС (0,3 мкг/мл) *in vitro* збільшувала продукцію NO в супернатанті моноцитів здорових осіб (на 88,2 %, $P < 0,001$) порівняно з вихідним рівнем (таблиця). Додавання L-аргініну продемонструвало дещо менше підвищення синтезу NO (на 59,65 % порівняно з вихідним рівнем; $P < 0,01$), що може бути наслідком функціонування альтернативних шляхів утилізації L-аргініну, наприклад аргінази-1, пригнічення якої дещо підвищувало продукцію нітритів моноцитами. Підтвердженням превалювання активності iNOS над аргіназою-1 в моноцитах здорових осіб були результати використання селективного інгібітора iNOS. Останній пригнічував продукцію NO в 1,83 рази ($P < 0,001$) порівняно з вихідним рівнем. Причому різниця між абсолютними величинами продукції NO при роздільній інкубації моноцитів з L-аргініном і ЛПС (близько 20 %) свідчить про високу чутливість моноцитів до класичного стимулятора їхньої активності – бакте-

ріального ЛПС. Результати інгібіторного аналізу дали змогу оцінити участь та ефекти різних медіаторів і трансдукторів у реалізації впливу ЛПС на експресію іNOS. Визначено, що активація експресії іNOS при інкубації із ЛПС тісно пов'язана з метаболізмом АК. Введення в суспензію клітин інгібіторів 5-ліпооксигенази (5-ЛОГ) і циклооксигенази (ЦОГ) супроводжувалося пригніченням ЛПС-стимульованої продукції NO – на 26,73 (P<0,01) й 20,3 % відповідно (P<0,05). Менш значимим був вплив ПкС і ФДЕ – їх інгібітори зменшували амплітуду ЛПС-стимульованої продукції нітритів на 13,37 і 11,63 % відповідно (P<0,05). Використання інгібітора ПкА продемонструвало негативний механізм регуляції продукції оксиду азоту з боку цАМФ–ПкА – Н89 підвищував вміст нітритів у культуральному середовищі на 8,91 % (P<0,05). Наведені результати дослідження у здорових осіб свідчать про зв'язок ЛПС-стимульованої активності іNOS моноцитів з активацією 5-ЛОГ і ЦОГ, та меншою мірою – із ПкС і ФДЕ.

За умов ранового процесу відзначено активацію системи моноцитів-макрофагів. Так, на момент госпіталізації (через 3–6 год після формування рани) базальна продукція нітритів моноцитами підвищувалася на 35,7 % порівняно з контролем (P<0,01). Цей феномен супроводжувався збільшенням продукції NO, стимульованої L-аргініном і ЛПС на 74,2 та 154,6 % відповідно відносно вихідного рівня (P<0,001). Порівняння ефектів субстрату та стимулятора активності іNOS з такими у здорових осіб виявило зростання амплітуди ефекту на 24,37 і 41,55 % відповідно (P<0,01). Отриманий результат свідчить про підвищення не тільки базальної, але й стимульованої продукції NO моноцитами внаслідок активації іNOS. Цей висновок підтверджувався використанням інгібітора згаданого ферменту, що знижував продукцію NO більше ніж удвічі. Аналіз механізмів реакції іNOS моноцитів на ЛПС показав, що посилення відповіді на бактеріальні стимули опосередковані насамперед активацією метаболізму АК. Амплітуда ефекту

Динаміка і механізми регуляції продукції нітритів моноцитами-макрофагами (нмоль NO₂ · мл⁻¹ · 10⁻⁶ клітин) за умов ранового процесу

Схема досліджу	Контроль	Рановий процес			
		1-ша доба	3-4-та доба	7-10-та доба	14-18-та доба
Базальна продукція (вихідний рівень)	22,55±1,37	30,6±2,11 ^{##}	41,20±3,2 ^{###}	28,9±2,07 [#]	23,7±1,22
Введення					
L-аргініну	36,1±2,21 ^{**}	53,3±3,15 ^{***}	63,4±3,18 ^{***}	42,3±3,11 ^{**}	32,4±2,17 ^{**}
L-NIL	12,35±0,66 ^{***}	14,5±1,26 ^{***}	15,6±0,84 ^{***}	15,0±0,93 ^{***}	13,2±0,79 ^{**}
L-нормпваліну	26,6±2,02 [*]	36,7±2,19 [*]	45,1±2,77	46,1±2,53 ^{***}	30,6±2,28 ^{**}
Стимулювання					
ліпополісахаридом	40,42,24 ^{***}	77,6±4,82 ^{***}	96,4±5,65 ^{***}	48,3±2,71 ^{***}	39,2±2,84 ^{***}
зі стауроспорином	35±1,71 [•]	65,1±3,41 [•]	71,4±3,64 ^{••}	29,2±2,0 ^{•••}	33,4±2,22 [•]
зі нордигідроуретиковою кислотою	29,6±1,89 ^{••}	46,2±2,60 ^{••}	46,22,81 ^{•••}	37,1±2,68 ^{••}	31,1±3,0 ^{••}
з індометацином	32,2±2,0 ^{••}	53,2±2,91 ^{••}	61,3±3,96 ^{•••}	27,0±1,42 ^{•••}	29,3±1,48 ^{••}
з Н-89	44,1±1,24 [•]	81,3±3,88 [•]	100,1±5,7 [•]	55,2±2,26 ^{••}	47,2±2,91 ^{••}
з теофіліном	35,7±1,9 [•]	59,1±3,02 ^{••}	62,33,31 ^{•••}	43,3±3,13 [•]	36,1±2,45 [•]

*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 порівняно з вихідним рівнем;

•P<0,05, ••P<0,01, •••P<0,001 порівняно зі значеннями ліпополісахаридстимульованої продукції;

#P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 порівняно з контролем.

інгібітора 5-ЛОГ виявилася практично в 1,5 раза вищою ($P < 0,01$), ніж у здорових осіб. При інкубації із НГДУК продукція NO зменшувалася на 40,72 % ($P < 0,01$), тоді як інгібітор ЦОГ знижував ЛПС-стимульовану продукцію нітритів моноцитами на 31,44 % ($P < 0,01$). Використання інгібітора ФДЕ призводило до зменшення продукції NO на 23,07 % ($P < 0,05$), тоді як стауроспорин пригнічував ЛПС-стимульовану продукцію нітритів лише на 16,24 % ($P < 0,05$). На цьому тлі практично нівелювався ефект інгібітора ПкА. Таким чином, ЛПС-стимульована продукція NO проявлялася наступною закономірністю активації ферментних систем та їх впливом на iNOS – $\uparrow 5\text{-ЛОГ} > \uparrow \text{ЦОГ-2} > \uparrow \text{ФДЕ} > \uparrow \text{ПкС} > \downarrow \text{ПкА}$.

Через 3–4 доби ранового процесу базальна продукція нітритів моноцитами сягала максимального рівня, підвищуючись на 34,64 ($P < 0,01$) і 82,71 % ($P < 0,001$) порівняно з попереднім строком і контролем відповідно. Цей феномен був пов'язаний з активацією iNOS – інгібітор ферменту знижував продукцію NO в 2,46 раза ($P < 0,01$) щодо вихідного рівня, тоді як інгібітор аргінази-1 мало впливав на продукцію нітритів моноцитами. При збереженні амплітуди стимулювального ефекту L-аргініну на рівні, близькому до контрольного, ефект ЛПС був вищим від значень у здорових осіб на 30,74 % ($P < 0,01$). Найбільш значимим механізмом реалізації цього ефекту ЛПС, як і раніше, була активація 5-ЛОГ. Вплив інгібітора даного ферменту збільшився на 28,51 % ($P < 0,01$) порівняно з попереднім терміном, перевищивши контрольне значення практично удвічі ($P < 0,001$). Паралельно відзначалося підвищення амплітуди ефектів інгібіторів ЦОГ і ФДЕ. На тлі низької активності ПкА максимальним виявився приріст активності ПкС (на 62,74 %; $P < 0,01$). Ефект стауроспорину на ЛПС-стимульовану активність iNOS сягав 26,42 %, тим самим перевищував контрольне значення практично

удвічі. У структурі ЛПС-стимульованої відповіді зберігалася описана закономірність співвідношення активності ферментів: $5\text{-ЛОГ} > \text{ЦОГ} = \text{ФДЕ} > \text{ПкС} > \text{ПкА}$.

Однак через 7–10 діб ситуація значно мінялася. Базальна продукція нітритів статистично значуще знизилася, хоча як і раніше перевищувала контрольне значення на 29,16 % ($P < 0,01$). Стимулювальний вплив L-аргініну на продукцію NO був нижчим від контролю, ймовірною причиною цього було збільшення активності аргінази-1. Використання її селективного інгібітора підвищувало продукцію NO на 59,17 % ($P < 0,01$), що перевищувало ефект L-аргініну практично в 1,5 раза ($P < 0,01$). Це свідчить про зміну домінуючого шляху метаболізму згаданої амінокислоти в моноцитах. Цікаво, що зміна метаболізму L-аргініну на продукцію поліамінів супроводжувалася зниженням чутливості моноцитів до інкубації з ЛПС. Так, додавання останнього викликало значно менший ефект на продукцію нітритів порівняно з таким у попередній термін дослідження ($P < 0,01$) та в контролі. Цей факт відображає тимчасове зниження антимікробної резистентності організму в зазначену фазу ранового процесу. При цьому відзначені принципові зміни в структурі внутрішньоклітинної сигналізації моноцитів. Амплітуда інгібіторного ефекту блокатора 5-ЛОГ знижувалася на 56,4 % ($P < 0,01$) порівняно з попереднім строком і була на 14,27 % нижчою від контролю ($P < 0,05$). На відміну від цього, активність ЦОГ продовжувала підвищуватись. Інгібітор згаданого ферменту знижував ЛПС-стимульовану продукцію нітритів на 43,75 %, причому ефект модулятора виявився більш ніж удвічі вищим від такого в контролі ($P < 0,01$). Паралельно підвищувалася активність ПкС, її інгібітор зменшував ЛПС-стимульовану активність iNOS на 39,58 % ($P < 0,01$), що майже удвічі перевищувало контрольне значення. Вплив ПкА зростав, про що свідчить підвищення на 14,5 %

($P < 0,05$) ЛПС-стимульованої продукції нітритів за умов інкубації з Н-89. Це може свідобрати участь ПкА в зміні базальної та ЛПС-стимульованої продукції NO, а також індукції аргінази-1. Підвищення ефективності функціонування сигнальних шляхів, асоційованих із циклічними нуклеотидами, супроводжувалося зниженням ролі ФДЕ. Ефект інгібітора ФДЕ зменшувався на 70,86 % порівняно з попереднім терміном спостереження ($P < 0,01$). Таким чином, через 7–10 діб ранового процесу знижується базальна продукція NO в супернатанті моноцитів внаслідок пригнічення iNOS й активації аргінази-1. Зменшення ЛПС-стимульованої реакції iNOS було пов'язане з такими змінами в системі сигналізації: \uparrow ЦОГ-2 = \uparrow ПкС $>$ \uparrow ПкА при \downarrow 5-ЛОГ й \downarrow ФДЕ.

Через 14–18 діб ранового процесу базальна продукція нітритів в супернатанті моноцитів поверталася до вихідного рівня. Однак використання модуляторів стану системи внутрішньоклітинної сигналізації дало змогу виявити низку метаболічних особливостей. По-перше, зберігалася висока активність аргінази-1. Хоча амплітуда ефекту інгібітора цього ферменту й знизилася на 55,07 % ($P < 0,01$) порівняно з попереднім терміном дослідження, вона залишалася більше ніж на 70 % вищою від контролю ($P < 0,01$). По-друге, незважаючи на завершення ранового процесу, у всіх пацієнтів зберігалася знижена реакція на введення ЛПС. Цей феномен був пов'язаний із збереженням більш високої щодо контролю активності ЦОГ (на 26,33 %; $P < 0,05$) та підвищенням активності ПкА (в 2,33 раза ($P < 0,001$)).

ОБГОВОРЕННЯ

Представлені результати свідчать про істотну зміну активності iNOS за умов ранового процесу. Відповідь моноцитів-макрофагів вважається важливим захисним механізмом, що забезпечує гіперпродукцію

NO при ушкодженні тканин шкіри. Утворений з NO і O_2^- пероксинітрит є сильним окисником, а у високих концентраціях діє як цитотоксичний та імуногенний агент внаслідок ушкодження ДНК і модуляції активності багатьох ферментів [4, 10, 12, 15]. Це забезпечує потужний бактерицидний ефект, що дає можливість позитивно трактувати підвищення продукції NO та чутливості моноцитів до ЛПС, зареєстроване з 1-ї по 3–4-ту добу ранового процесу. З огляду на те, що бактеріальний ЛПС відноситься до класичних активаторів моноцитів, можна стверджувати, що підвищення ЛПС-стимульованої активності iNOS супроводжується посиленням продукції прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-15, IL-18, фактора некрозу пухлин α і IL-12), хемокінів (CCL15, CCL20, CXCL13, CXCL9, CXCL10 й CXCL11), а також активних радикалів кисню [15]. Однак така реакція забезпечує не тільки елімінацію мікроорганізмів і залучення нейтрофілів у зону ушкодження, але й призводить до вторинної альтерації тканин [8, 11]. Цьому сприяє визначене в роботі підвищення активності 5-ЛОГ і ФДЕ, що традиційно пов'язують зі збільшенням внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} , активацією оксидативного стресу, альтерацією й апоптозом клітин у рані [23]. Варто відмітити одночасність зміни активності iNOS і 5-ЛОГ, яка підвищувалася починаючи з 1-ї доби, і сягала піка на 3–4-ту добу, після чого знижувалася. Цей феномен може свідчити про участь зазначених ферментних систем у реалізації прозапальної й антимікробної функції макрофагів, а також визначає характер взаємин макрофагів з іншими клітинами у фазу гострої запальної відповіді організму на ушкодження.

Слід зазначити, що зниження активності iNOS у фазу формування грануляцій супроводжувалося підвищенням активності аргінази-1 і зниженням ефекту ЛПС. Останнє може свідчити про зміни регуляції

моноцитів-макрофагів внаслідок їхнього переходу із класичного шляху стимуляції на альтернативний. Він реалізується за участю цитокінів (ІЛ-4 і ІЛ-13), імунних комплексів, трансформувального фактора росту і глюкокортикоїдів [19]. Активація аргінази-1, що визначає продукцію регуляторних поліамінів, а також проліну, ймовірно, забезпечує інтенсифікацію фібринолізу при формуванні грануляційної тканини [4, 9, 17]. З цієї позиції динаміка активності iNOS протягом 2-го тижня ранового процесу може бути критерієм прогнозування загоєння дефектів шкіри та слизових оболонок. Формування грануляцій у рані також супроводжувалося зниженням активності 5-ЛОГ і переважною продукцією простаноїдів, що забезпечують вазодилатацію, цитопротекцію, стимуляцію експресії фактора росту судинного ендотелію і ангиогенезу [22]. Серед важливих внутрішньоклітинних механізмів, що контролюють зміни функціональної активності моноцитів-макрофагів, слід відзначити ПкА, що за результатами проведеного інгібіторного аналізу була спряжена з пригніченням продукції нітритів і стимуляцією аргінази-1, наслідком чого може бути підвищення секреторної активності клітин сполучної тканини [14, 18, 20]. Причому стимуляція ПкА у фіналі ранового процесу, разом із підтримкою високої активності ПкС і ЦОГ, може відображати роль зазначених ферментних систем у реалізації процесу ремоделювання сполучної тканини після епітелізації ранової поверхні.

Таким чином, різні фази ранового процесу супроводжуються зміною активності iNOS моноцитів, сполученої з перебуваннями в системі внутрішньоклітинної сигналізації. Протягом 1-ї доби після механічної травми (фаза альтерації та судинної реакції) підвищується базальна й ЛПС-стимульована активність iNOS і 5-ЛОГ, що сягає максимуму через 3–4 доби. Протягом 7–10 діб грануляції та епітелі-

зація ранової поверхні формуються на тлі максимальної активності ЦОГ, ПкС і стимуляції ПкА. Ці зміни супроводжуються зниженням базальної активності iNOS моноцитів й обмеженням їхньої реакції на ЛПС, а також стимуляцією аргінази-1, що конкурує за субстрат з iNOS. Через 14–18 діб сполучна тканина в ділянці рани ремоделювалася на фоні відновлення базальної активності iNOS до контрольного рівня, збереження активності ЦОГ і ПкС, та максимального підвищення ефектів ПкА, що було асоційовано з підтримкою високої активності аргінази-1. Зміни в системі внутрішньоклітинної сигналізації модулюють ефекторну функцію моноцитів-макрофагів, тому їхній аналіз може використовуватися для діагностики й корекції перебігу ранового процесу.

**М. Э. Баринова, В. Н. Ельский,
Э. Ф. Баринов, О. Н. Сулаева**

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ И МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ДИНАМИКЕ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА

Изучали закономерности и механизмы регуляции активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в моноцитах-макрофагах в динамике раневого процесса. Роль внутриклеточных сигнальных систем в модуляции активности iNOS моноцитов периферической крови 22 пациентов с травматическими ранами конечностей анализировали методом ингибиторного анализа *in vitro*. Показано, что с 1-х по 3–4-е сутки раневого процесса повышается базальная и стимулированная липополисахаридом продукция оксида азота, активность 5-липоксигеназы и фосфодиэстеразы. Активность циклооксигеназы и протеинкиназы С возрастала через 3 сут, достигала максимума через 7–10 сут во время формирования грануляций и эпителизации раневой поверхности. Активность протеинкиназы А, угнетающей iNOS, увеличивалась с 7–10 сут, достигая максимума через 14 сут, что сопровождалось активацией аргиназы-1. Мониторинг разных звеньев системы внутриклеточной сигнализации может использоваться для диагностики и коррекции течения раневого процесса.

Ключевые слова: раневой процесс, моноциты-макрофаги, индуцибельная NO-синтаза.

**M. E. Barinova, V.N. Yelsky, E.F. Barinov,
O.N. Sulayeva**

**FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONOCYTES
AND THE MECHANISMS
AND INTRACELLULAR REGULATION
OF INOS DURING WOUND PROCESS**

To investigate the dynamics and mechanisms of iNOS activity during wound process, the peripheral blood monocytes of 22 patients with acute foot wounds were analyzed. The basal and LPS-stimulated nitrites production was estimated at 1, 3-4, 7-10 and 14-18 days of wound process. iNOS activity and its molecular regulation was estimated by the inhibitory analysis. It was shown that since 1st to 3-4 day of wound process the basal and LPS-stimulated activity of iNOS, PDE and 5-LOX were elevated initially and then decreased. The COX and PkC activities increased after 3 days and reached the maximum level at days 7-10. The activity of PkA, which inhibits iNOS, intensively increased from 7-10th to 14-18th days of healing, and was accompanied by arginase-1 stimulation. Thus monitoring of intracellular signaling system can be used for diagnostics and correction of wound healing.

Key words: wound healing, monocytes-macrophages, iNOS.

M. Gorky Donetsk National Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барінов Е.Ф., Канана Н.М., Барінова М.Е. Взаємозв'язок між активністю iNOS моноцитів та eNOS тромбоцитів в динаміці експериментального цукрового діабету // Архів клініч. і експерим. медицини. – 2008. – 17, № 2. – С. 127–129.
2. Барінова М.Э. iNOS моноцитів крові при заживленні ран у больних с синдромом діабетическої стопи // Актуальні пробл. сучасної медицини. – 2009. – 9, Вип. 3. – С. 109–113.
3. Барінова М. Э., Сулаєва О.Н. Гетерогенність реакції макрофагів при заживленні ран нижніх кінцівок у больних сахарним діабетом // Морфологія. – 2009. – Т. III, № 1. – С. 22–27.
4. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2008. – 54, № 1. – С. 63–67.
5. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. Модуляція активності іонних каналів кліток арахідонової кислоти, продуктами її метаболізму і другими жирними кислотами // Цитологія. – 1995. – 37, № 1–2. – С. 5–65.
6. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И. Механізми Ca²⁺-сигналізації в перитонеальних макрофагах // Рос. фізіол. журн. ім. И.М. Сеченова. – 2000. – 86, № 8. – С. 1030–1048.
7. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики. – Донецьк: Видавець Папакіца Є.К., 2006. – 211 с.
8. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление. – М.: Медицина, 1991. – 272 с.
9. Agren M. S., Werthen M. The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds // Int. J. Lower Extr. Wounds. – 2007. – 6. – P. 82–97.
10. Aguilar D., Skrabanek L. Beyond tissue Info: functional prediction using tissue expression profile similarity searches // Nucleic Acids Res. – 2008. – 36, № 11. – P. 3728–3737.
11. Braiman-Wiksmann L., Solomonik I., Spira R., Tennenbaum T. Invited review: Novel insights into wound healing sequence of events // Toxicol. Pathol. – 2007. – 35. – P. 767–779.
12. Barbato J.E., Zuckerbraun B.S., Overhaus M. Nitric oxide modulates vascular inflammation and intimal hyperplasia in insulin resistance and the metabolic syndrome // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 2005. – 289. – P. H228–236.
13. Cipollone F., Chiarelli F., Iezzi A. Relationship between reduced BCL-2 expression in circulating mononuclear cells and early nephropathy in type 1 diabetes // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2005. – 18, № 4. – P. 625–635.
14. Connelly L., Jacobs A.J., Palacios-Callender M. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression // J. Biol. Chem. – 2003. – 278. – P. 241–250.
15. Derakhshan B., Hao G., Groos S.S. Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide // Cardiovascular Res. – 2007. – 75. – P. 210–219.
16. Jarvinen T. A.H., Ruoslahti E. Molecular Changes in the Vasculature of Injured Tissues // Amer. J. Pathol. – 2007. – 171. – P. 702–711.
17. Kampfner H., Pfeilschifter J., Frank S. Expression and activity of arginase isoenzymes during normal and diabetes-impaired skin repair // J. Invest. Dermatol. – 2003. – 121. – P. 1544–1551.
18. Lee S. P., Serezani C. H., Medeiros A. I., Ballinger M. N. Crosstalk between Prostaglandin E2 and leukotriene B4 regulates phagocytosis in alveolar macrophages via combinatorial effects on cyclic AMP // J. Immunol. – 2009. – 182. – P. 530–537.
19. Lowson S.M. Alternatives to nitric oxide // Brit. Med. J. – 2004. – 70. – P. 119–131.
20. Morris S.M. Enzymes of arginine metabolism // J. Nutr. – 2004. – 134. – P. 2743–2747.
21. Meier M., King G.L. Protein kinase C activation and its pharmacological inhibition in vascular disease // Vascular Med. – 2000. – 5. – P. 173–185.
22. Medow M. S., Taneja I., Stewart J. M. Cyclooxygenase and nitric oxide synthase dependence of cutaneous reactive hyperemia in humans // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 2007. – 293. – P. H425–H432.

23. Radmark O., Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation // J. Lipid Res. – 2009. – **50**. – P. S40–S45.
24. Tchaikovski V., Olieslagers S., Вцhmer F.D. Diabetes

mellitus activates signal transduction pathways resulting in vascular endothelial growth factor resistance of human monocytes // Circulation. – 2009. – **120**, № 2. – P. 150–159.

Донецьк. нац. мед. ун-т ім. М. Горького
E-mail: barinoff@dsmu.edu.ua

Матеріал надійшов до
редакції 07.09.2009