

М.Э. Баринава, О.Н. Сулаева

Молекулярные механизмы регуляции iNOS моноцитов

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, кафедра дерматовенерологии, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии

Ключевые слова: моноциты, оксид азота

Полнота реализации защитной воспалительной реакции во многом определяется эффективностью внутриклеточных механизмов индукции провоспалительной активности клеток. В первую очередь это касается моноцитов-макрофагов, учитывая роль данных клеток в стимуляции микробицидной активности нейтрофилов, реализации антигенной презентации и инициации системы специфической иммунной защиты организма, регуляции фаз репаративного процесса, пролиферативной и секреторной активности фибробластов. Активация моноцитов-макрофагов сопровождается стимуляцией экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), включающей каскад событий, направленных на поддержание иммунологического гомеостаза. Однако помимо бактериальных агентов возможна независимая модуляция активности iNOS со стороны медиаторов воспаления и повреждения клеток (ФАТ, эйкозаноиды, цитокины), мессенджерно-трансдукторных систем (протеинкиназы), что определяет реализацию системы обратной связи в деятельности клеток и реципрокную регуляцию различных морфогенетических процессов. Так, например, известно, что развитие синдрома эндотелиальной дисфункции и/или метаболического синдрома сопровождается стимуляцией экспрессии iNOS, имеются данные о взаимосвязи метаболизма простаноидов с активностью iNOS, однако молекулярные механизмы этих феноменов неизвестны, что и определило **цель данной работы**.

Материал и методы исследования. Из периферической крови методом градиентного центрифугирования выделяли мононуклеарные клетки, которые затем отмывали забуференным изотоническим раствором NaCl и ресуспендировали в бессывороточной культуральной среде RPMI 1640 (ICN). Прилипшие к пластику мононуклеарные клетки выделяли после 3-х часовой инкубации в луночном планшете ("Flow Lab") с использованием CO₂-инкубатора. Клетки (10⁶ на лунку) помещали в 96-луночный планшет в 200 мкл среды RPMI-1640 с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки. В I серии исследовали продукцию NO без стимуляции, при добавлении липосахаридов (ЛПС 0,3 мкг/мл; E.coli фирмы "Calbiochem", США); стимулятора и ингибитора iNOS: L-аргинина и Аминогуанидина (АГ). После инкубации в течение 24ч при 37°C анализировали продукцию NO по накоплению в культуральной среде нитрит-ионов NO²⁻. Во II серии клетки инкубировали с: циклогексимидом (ингибитор синтеза протеинов, в частности фермента iNOS); стауроспорином (ингибитор протеинкиназы C – ПкС);

форболмирилатацетатом (ФМА, стимулятор ПкС); Н-89 (ингибитор ПкА), NaF (стимулятор ПкА); нордигидроуретиковой кислотой (НГДУК, ингибитор 5-липоксигеназы – 5-ЛОГ), индометацином (ингибитор циклооксигеназы) и фактором активации тромбоцитов (ФАТ, стимулятор 5-ЛОГ). Затем в лунки (за исключением тех, в которые был введен ФМА, NaF и ФАТ) добавляли ЛПС, продолжали инкубацию в течение 24ч и исследовали содержание NO в культуральной среде. В работе использованы реактивы "Sigma" (США).

Результаты и обсуждение. Стандартная доза ЛПС (0,3 мкг/мл) *in vitro* вызывала увеличение продукции NO моноцитами здоровых лиц на 64,1% (p<0,01) по сравнению с контролем. Добавление L-аргинина вызывало повышение синтеза NO в 2,11 раза (p<0,001). Разница между абсолютными величинами продукции NO при инкубации моноцитов с L-аргинином и ЛПС отражает участие бактериального ЛПС в реализации максимальной резервной мощности iNOS. АГ подавлял синтез NO на 47,1% (p<0,01). Для определения механизмов передачи активирующего сигнала от центров связывания ЛПС к iNOS, была произведена предварительная обработка моноцитов ингибиторами либо стимуляторами различных звеньев системы внутриклеточной сигнализации. Полученные данные свидетельствуют об активации биосинтеза iNOS под действием ЛПС, о чем свидетельствует отмена регистрируемого эффекта при добавлении к моноцитам циклогексимида. ПкС и ПкА участвуют в модуляции активности iNOS, причем ПкС потенцирует эффект ЛПС на iNOS, поскольку стауроспорин ингибировал эффект ЛПС на 67,1% (p<0,01). При этом возможен и прямой эффект ПкС на экспрессию iNOS. Об этом свидетельствует амплитуда влияния ФМА без добавления ЛПС. В стимуляцию продукции NO в равной степени участвуют метаболиты ЦОГ и ЛОГ, поскольку индометацин и НГДУК снижали эффект ЛПС соответственно на 53,7% и 56,3% (p<0,01). Мощным стимулятором экспрессии iNOS и продукции NO является ФАТ.

Таким образом, эффект ЛПС на экспрессию iNOS реализуется при участии ПкС, ПкА, простагландинов и лейкотриенов. При этом возможен прямой стимулирующий эффект ПкС и ФАТ на синтез iNOS *de novo*. Многофакторность регуляции данного фермента определяет разнообразие вариантов его участия в контроле воспалительно-репаративных процессов в норме и при хронических заболеваниях. Полученные данные могут использоваться для диагностики и интерпретации механизмов нарушения экспрессии iNOS и снижения эффективности воспалительной реакции.