

Роль NF-κB у диференціюванні та активації нейтрофілів під час загоєння опікової рани шкіри щурів

Л.В. Натрус¹, І.М. Рижко¹, О.О. Лісаковська², А.О. Тихомиров²,
Д.О. Лабудзинський², Т.І. Панова³

¹ Науково-дослідний інститут експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Київ;

² Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;

³ Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ;
e-mail: Lnatrus777@gmail.com

Досліджено взаємозв'язок рівня експресії ключових регуляторних протеїнів прозапального профілю: ядерний фактор каппа В – NF-κB, його інгібувальна субодинаця – IκB-α, фактор росту ендотелію судин А – VEGF-A та ендотеліальний рецептор – FLT1 у регенераті сполучної тканини та змін кількості гранулоцитів кісткового мозку й нейтрофілів периферичної крові у динаміці (3, 7, 14, 21-ша доба) гоєння опікової рани шкіри щурів лінії Вістар. Виявлено лінійний кореляційний зв'язок між динамікою продукції NF-κB та кількістю гранулоцитів ($r = 0,739$; $P < 0,01$); між кількістю нейтрофілів та вмістом VEGF-A ($r = 0,708$; $P < 0,01$), між вмістом FLT1 та VEGF-A ($r = 0,865$; $P < 0,01$); між кількістю нейтрофілів та вмістом FLT1 ($r = 0,472$; $P < 0,05$). Отримані результати надали підставу уявити наявність різнорівневого регуляційного ланцюга у системі сполучна тканина – кістковий мозок – периферична кров, який виникає за нормальних фізіологічних умов і складає ключовий механізм регуляції ангиогенезу. Вірогідно, NF-κB активує продукцію факторів росту мієлоїдних попередників та регулює диференціювання гранулоцитів у кістковому мозку; нейтрофіли із крові потрапляють до пошкодженої ділянки опікової рани, секретують ендотеліальні ростові фактори та стимулюють у сполучнотканинному регенераті експресію ендотеліальних рецепторів до вказаних лігандів.

Ключові слова: регенерація шкіри; рана; кістковий мозок; нейтрофіли; ангиогенез.

ВСТУП

Реакція тканини на пошкодження - динамічний процес, що складається з послідовних етапів (запалення, проліферації та ремоделювання), спрямований на відновлення архітектури та функції тканин. Пошкоджені та некротичні клітини DAMP-патернами (англ. damage-associated molecular patterns), активують експресію хемокінів та ліпідних медіаторів за різними механізмами [1]. Перш за все, DAMP активує сигнальні шляхи, залежні від транскрипційного фактора κB (NF-κB, англ. nuclear factor κB), що призводить до ядерної транскрипції та зростання в клітині продукції

регуляторних молекул тощо. Вважається, що вирішальну роль в загоєнні ран відіграє функціональний взаємозв'язок NF-κB та транскрипційної молекули NFκB2. NFκB2 контролює запалення, пов'язане з репарацією, і захищає від надмірного накопичення активних форм кисню, а NF-κB активує вроджену імунну реакцію, проліферацію та міграцію клітин, модулює експресію матричних металопротеїназ, секрецію цитокінів і факторів росту для загоєння ран [2]. За звичайних умов NF-κB має цитоплазматичну локалізацію у вигляді димеру в комплексі із гальмівною субодинацею IκB. У відповідь на DAMP-стимулюван-

© Л.В. Натрус, І.М. Рижко, О.О. Лісаковська, А.О. Тихомиров, Д.О. Лабудзинський, Т.І. Панова

ня цей фактор вивільнюється з інгібіторного комплексу та транслокується до ядра, де зв'язується зі специфічними послідовностями ДНК. Експериментально показано, що у відповідь на активацію фактора некрозу пухлин α (ФНП- α) NF- κ B фосфорилується в ділянці Ser311 [3, 4].

Оскільки запалення є складним тривалим фізіологічним процесом, роль NF- κ B у розвитку тканинної реакції не може бути інтерпретована однозначно і продовжує вивчатися. Дослідження плеiotропних ефектів NF- κ B при запаленні необхідні для подальшого визначення шляхів використання його як потенційної терапевтичної мішені [5, 6]. Регенерація рани також розглядається як багатокомпонентна система взаємодії клітин, тканин, цитокінів, хемокінів і факторів росту, клітинних і позаклітинних учасників [7]. Активно вивчаються процеси проліферації та диференціювання в кістковому мозку під час гоєння рани. Показано, що термічне ушкодження шкіри мишей викликало активну захисну реакцію у вигляді переорієнтації кровотворення в напрямку мієлоїдних ліній, із тривалим збільшенням вмісту сироваткових цитокінів: гранулоцитарно-колонієстимулюючого фактора (G-CSF, англ. granulocyte-colony stimulating factor) і інтерлейкіну 6 (IL-6) та збільшенням нейтрофілів у кістковому мозку [8]. G-CSF розглядається як перемикач, який активує вроджені імунні відповіді але пригнічує адаптивні. Автори показали, що вісь G-CSF–STAT3, де STAT3 (англ. signal transducer and activator of transcription 3) – сигнальний білок і активатор транскрипції, є ключовою в захисному механізмі зниження ризику посттравматичної інфекції [8]. Експериментально доведено виникнення градієнтів цитокінів у пошкодженій тканини, які впливають на кістковий мозок і направляють лейкоцити для переміщення в місце поранення [9]

Важливою частиною репарації є ангіогенез – динамічний процес, що регулюється як системними сигналами з плазми крові, так і локальними – з екстрацелюлярного матриксу.

Фактор росту ендотелію судин (VEGF, англ., vascular endothelial growth factor), ангіопоетин, фактор росту фібробластів і трансформуючий ростовий фактор β – найпотужніші ангіогенні цитокіни [10]. Геномна регуляція експресії VEGF знаходиться під контролем NF- κ B, але існують докази, що джерелом секреції першого є нейтрофіли [11]. Нейтрофіли, які інфільтруються в тканини, не тільки продукують VEGF, але здатні взаємодіяти з епітеліальними клітинами, індукуючи в них його вироблення [9, 10]. Макрофаги, моноцити та нейтрофіли можуть стимулювати ангіогенез доставкою проангіогенних факторів росту (наприклад, VEGF-A та VEGF-C), а також вивільненням протеїназ, які розщеплюють компоненти екстрацелюлярного матриксу, сприяючи вивільненню факторів росту і проростанню судин [7, 12].

Метою нашої роботи було дослідження регуляторних молекулярних механізмів тканинної репарації вивченням зв'язку кількісного вмісту регуляторних цитокінів сполучної тканини, клітин кісткового мозку та периферичної крові в динаміці гоєння опікової рани шкіри шурів.

МЕТОДИКА

Динаміку (3, 7, 14, 21-ша доба) гоєння опікової рани шкіри досліджували на 24 статевозрілих шурах-самцях лінії Вістар (180–210 г) без соматичної патології. Всі маніпуляції проводили з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами відповідно до міжнародних та національних положень стосовно проведення експериментів із залученням тварин: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001), Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Україна, 2006), засідання комісії з біоетики НМУ, протокол № 94 від 16.03.2016.

Для експериментального моделювання опіку щурам напередодні, в умовах вільної поведінки, оголювали прямокутну ділянку шкіри тулуба нанесенням крему для депіляції з експозицією 4–5 хв. Шкіру після процедури обробляли фізіологічним розчином і антисептиком, вона була не пошкодженою, рівномірно гладенькою, без волосяного покриву. Наступного дня під ефірним наркозом моделювали опік, використовуючи дві мідні пластини у вигляді еліпса, розміром 3,7×4,5 см і площею 0,0052 м². Пластини витримували в окропі (100°C) 10 хв і накладали одночасно симетрично на обидві оголені частини тіла з експозицією 10 с. Загальна площа опіку шкіри становила 18–20% поверхні тіла, що є цілком достатнім для формування дермального поверхневого опіку. Тварин декапітували після введення летальної дози тіопенталу натрію.

Мієлограму вивчали за стандартною методикою Арінкіна. Кістковий мозок відділяли зі стегнової кістки вимиванням з дистального кінця на знежирене предметне скло. Мазки фіксували етанолом і фарбували за Романовським–Гімзою. На кожному склі підраховували 500 клітинних елементів, визначали кількість клітин кожного виду і перераховували у відсотки. Формені елементи периферичної крові підраховували за допомогою гематологічного аналізатора MicroCC та візуально ідентифікували у фіксованому та пофарбованому мазку.

У тканинному регенераті методом Вестерн-блот-аналізу визначали вміст NF- κ B, I κ B- α , VEGF-A та ендотеліального рецептора FLT-1. Для приготування зразків фрагменти шкіри (200–250 мг) подрібнювали у порцеляновому тиглі у рідкому азоті і розтирали до гомогенного стану. Наважки зразків шкіри (100 мг) змішували з буфером екстракції протеїнів RIPA (20 ммоль/л тріс-HCl, pH 7,5; 1% тритону X-100, 150 ммоль/л NaCl, 1 ммоль/л EDTA, 1%-го дезоксихолату натрію) у співвідношенні 1:10 (маса/об'єм) та сумішшю інгібіторів протеїнази і фосфатази (PIC), інкубували на льоду протягом 20 хв

та піддавали ультразвуковій дезінтеграції за допомогою приладу Sartorius «Labsonic» (Німеччина). Отримані гомогенати центрифугували при 14000g протягом 20 хв при 4°C. Після центрифугування надосадову рідину збирали та переносили до пластикових пробірок типу Eppendorf. Концентрацію загального протеїну вимірювали на спектрофотометрі CF-2000 «Спектр» (Росія). Протеїнові екстракти змішували з буфером Леммлі (60 ммоль/л тріс-HCl, pH 6,8; 2%-го SDS; 0,01%-го бромфенолового синього; 10%-го гліцерилу, 5%-го β -меркаптоетанолу) та витримували при 95°C протягом 5 хв для подальшого зберігання. Розділяли протеїнові зразки шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі у вертикальній камері «BioRad» (США), використовуючи електродний буфер (25 ммоль/л тріс-HCl, pH 8,3, 0,192 моль/л гліцину, 0,1% SDS). Кількість загального протеїну, що вносили до лунок гелю, становила 50 мкг. Концентрування зразків проводили при напрузі, що не перевищувала 50 В, розділення – 110 В. Для ідентифікації молекулярних мас протеїнів використовували суміш забарвлених протеїнових маркерів PageRuler «ThermoFisher Scientific» (США).

Перенесення протеїнів з гелю до нітроцелюлозних мембран з діаметром пор 0,45 мкм проводили у трансфер-буфері з pH 8,3 (25 ммоль/л тріс-HCl-буфера, pH 8,3; 0,192 моль/л гліцину, 0,1% додецилсульфату натрію, 20% метанолу) протягом 60 хв при 350 А та постійному охолодженні. Мембрани відмивали від залишків буфера у 50 ммоль/л фосфатному фізіологічному буфері, що містить 0,05%-го буферного фосфату (PBST, англ. phosphate buffered saline with Tween-20) із pH 7,4. Блокування місць неспецифічної сорбції антитіл проводили у 5%-му розчині знежиреного сухого молока «Carnation» (США) у PBST протягом 60 хв при кімнатній температурі. Після блокування мембрани інкубували зі специфічними антитілами проти VEGF-A «Merck» Німеччина, кат. № 05-1117, 1:2000 у PBST, фосфорильованої за Ser 311 субоди-

ниці р65 NF-κB «Santa Cruz» (США), 1:200 у PBST, ІκВ-α «Santa Cruz» (США), 1:500 у PBST та FLT-1 «Santa Cruz» (США), 1:500 у PBST, протягом 16 год при 4°C. Далі мембрани промивали у горизонтальному шейкері у 3 змінах PBST по 5 хв кожна, після чого інкубували 90 хв при кімнатній температурі з відповідними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому: анти-миша IgG 1:5000 «Abcam» (США), або анти-кріль IgG 1:2500 «Bio-Rad Laboratories», (США). Неспецифічно сорбовані вторинні антитіла відмивали у 3 змінах PBST. Детекцію комплексів антиген-антитіло проводили за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції, використовуючи 1,25 ммоль/л розчину люмінолу у ДМСО; 2,72 ммоль/л розчину кумарової кислоти у ДМСО; 0,1 моль тріс рН 8,5 та 0,01% H₂O₂. Візуалізацію специфічного забарвлення здійснювали на рентгенівських плівках «Konica Minolta» (Японія). Отримані плівки сканували для проведення кількісного денситометричного аналізу з використанням програми TL-120 «TotalLab» (США). Відносний вміст FLT-1, VEGF-A, NF-κB та ІκВ-α виражали в умовних одиницях оптичної густини (arbitrary units). За одиницю приймали вміст протеїнів у перший термін спостереження на 3-тю добу.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету IBM SPSS Statistics 23. Для перевірки розподілу на нормальність використовували критерій Шапіро–Уїлка. Порівняння показників на всіх термінах із даними на 3-тю добу проводили за критерієм множинного порівняння Шеффе і Т-критерієм Даннета де вважали значимою різницю $P < 0,05$. Діаграми надавали із вказанням довірчого інтервалу 95%. Кореляційний зв'язок визначали за коефіцієнтом кореляції Пірсона (r).

РЕЗУЛЬТАТИ

Мінімальний вміст NF-κB спостерігався на 7-му добу і був у 1,5 раза меншим ($P <$

0,05) ніж на 3-тю добу; на 14-ту та 21-шу добу поступово підвищувався в 1,3–1,4 раза ($P < 0,05$) відповідно (рис. 1, а). Вміст ІκВ-α (див. рис. 1, б) на 3-тю добу визначався у фонових концентраціях, надалі експресія протеїну суттєво зростала. На 14-ту добу визначався пік, де його концентрація була втричі вища ($P < 0,05$) порівняно з 7-ю добою. На 21-шу добу вміст вміст протеїну знизився в 1,4 раза ($P < 0,05$) порівняно з 14-ю добою. Експресія VEGF-A (див. рис. 1, в) відображала хвильову динаміку. Так, максимальний вміст спостерігався на 7-му добу і був більшим порівняно з 3-ю добою у 2,7 раза ($P < 0,05$). На 14-ту добу вміст зменшувався відносно 7-ї доби в 1,7 раза ($P < 0,05$) і на 21-шу добу знову підвищувався ($P < 0,05$). Експресія FLT-1 (див. рис. 1, г) також мала хвильову динаміку. На 7-у добу вміст FLT-1 підвищувався відносно 3-ї доби у 2,5 раза ($P < 0,05$), на 14-ту добу знижувався в 3,7 раза ($P < 0,05$), а на 21-шу стрімко зростав, майже у 10 разів ($P < 0,05$).

При аналізі мієлограми, по-перше, порівнювали кількість клітин кісткового мозку, що визначаються як загальні поліпотентні попередники: мієлоїдного – СМР (англ. common myeloid progenitor) та лімфоїдного – СLP (англ. common lymphoid progenitor) походження (рис. 2, а), і при підрахунку становлять 100%. Опікова рана не викликала суттєвих зміни кількості СМР. У всі терміни спостереження значення сягало 90%, із незначним недостовірним зниженням на 7-му добу до $86,55 \pm 2,19\%$. Відповідно кількість СLP підвищувалося лише на 7-му добу до $13,5 \pm 0,9\%$ порівняно зі значенням на 3-тю добу $10,5 \pm 0,4\%$, ($P < 0,05$), але на 14-ту знову знижувалася до попереднього значення і лишалася такою на 21-шу добу. Надалі ми проаналізували клітинні популяції, які входять до складу СМР і безпосередньо беруть участь у забезпеченні регенерації: моноцити кісткового мозку, незрілі гранулоцити (GRA1) та зрілі гранулоцити (GRA2). Відомо, що в нормі до 90% нейтрофільних гранулоцитів

накопичуються в кістковому мозку після їх кінцевої диференціації у вигляді депо, а їх вихід у периферичний кровотік відбувається під впливом регуляторних сигналів за потребою організму. Пул попередників – незрілих гранулоцитів відображає ступень проліферації в КМ. Кількість GRA1 мала хвильову динаміку (див. рис. 2, б), без достовірної різниці, із незначним зниженням на 7-му та 21-шу

добу. Кількість GRA2 відображала достовірне зниження на 7-му добу до значення $34,0 \pm 0,5\%$ від $41,7 \pm 0,8\%$ на 3-тю добу ($P < 0,05$), із поступовим підвищенням на 21-шу добу. Така динаміка GRA2 може пояснюватися зниженням проліферації клітин на 7-му добу і виходом у периферичний кровотік гранулоцитів (переважно це нейтрофіли) для подальшої міграції клітин у тканини. Динаміка

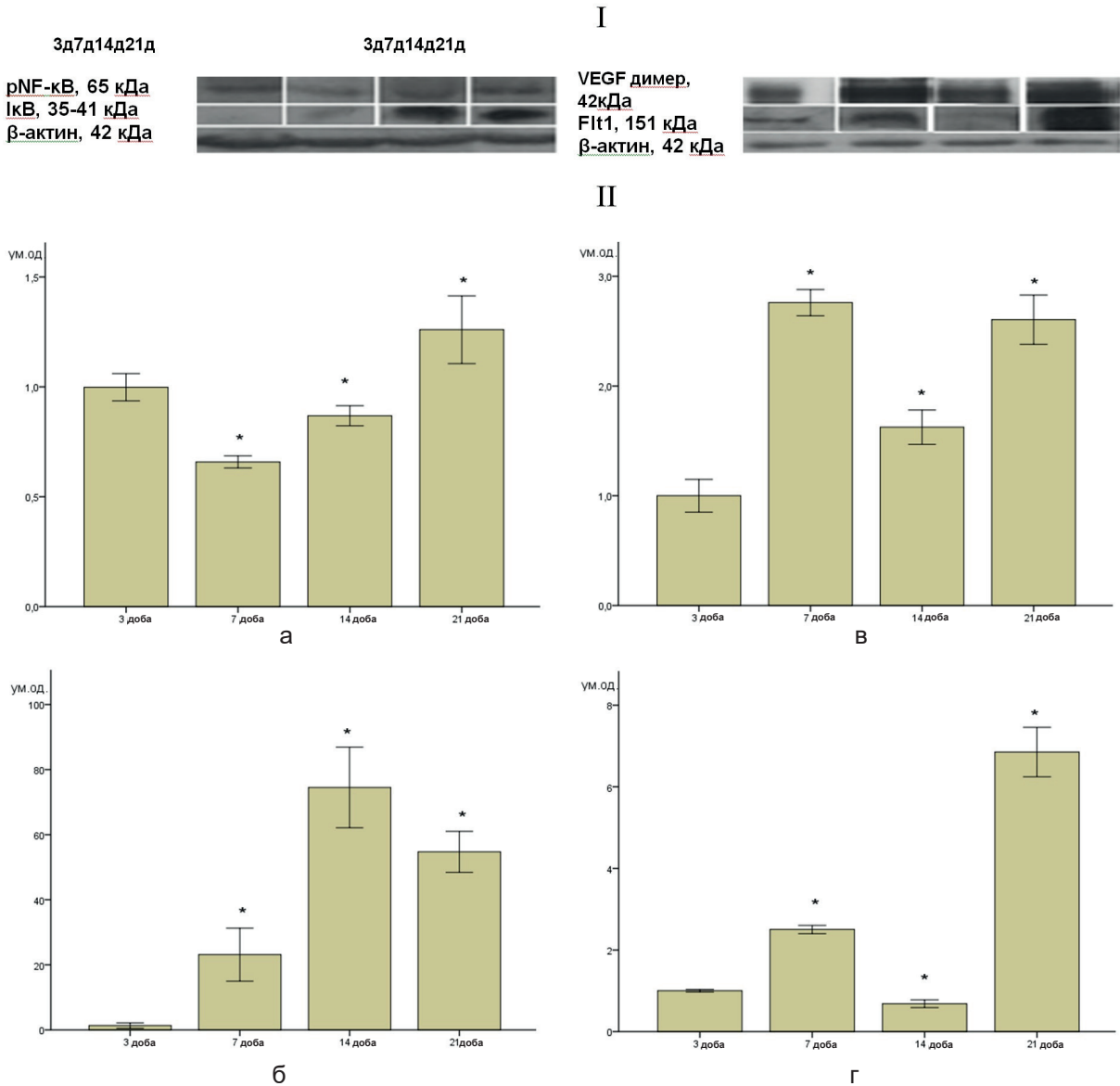


Рис. 1. Вміст протеїнів: NF-κB (а), IκB-α (б), VEGF (в), FLT1 (г) у регенерації сполучної тканини шкіри щурів у динаміці загоєння опікової рани (3, 7, 14, 21-ша доба). I – Імуноблота, II – гістограма вмісту протеїну відносно значення в перший термін спостереження (3-тя доба). *P < 0,05 порівняно з попереднім терміном спостереження

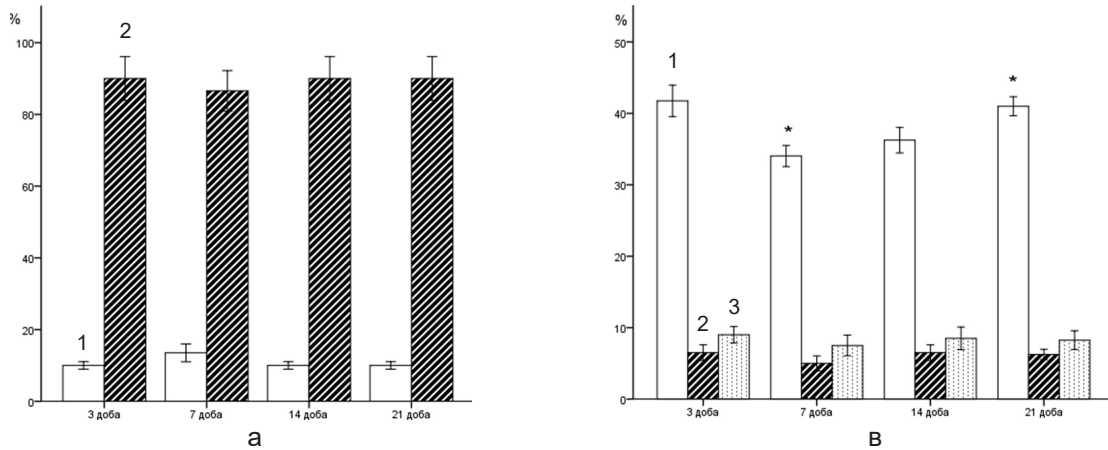


Рис. 2. Кількість елементів кісткового мозку в динаміці загоєння опікової рани (3, 7, 14, 21-ша доба). Загальні поліпотентні попередники (а): 1 – міелоїдного походження (CMP, common myeloid progenitor), 2 – лімфоїдного походження (CLP, common lymphoid progenitor). β -складові CMP: 1 – незрілі гранулоцити (GRA1), 2 – зрілі гранулоцити (GRA2), 3 – моноцити. * $P < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження

моноцитів у кістковому мозку була схожа на таку в групі загальних попередників CMP. На 3-тю добу спостерігалася найбільша кількість $9,0 \pm 0,4\%$, мінімум – на 7-му добу $7,5 \pm 0,5\%$ із незначним підвищенням на 14-ту та 21-шу добу до $8,2 \pm 0,5\%$.

При аналізі клітин периферичної крові було виявлено: лейкоцитоз в усі терміни спостереження і найбільш виражені коливання кількості нейтрофілів та моноцитів (рис. 3). При підрахунку нейтрофілів ми враховували загальну кількість поліморфноядерних клітин різного ступеня зрілості (сегменто-, паличкоядерні тощо). Так, кількість нейтрофілів достовірно зростала з $29,5 \pm 0,9$ на 3-тю добу до максимальних значень $44,5 \pm 0,7\%$ на 7-му добу ($P < 0,05$), на 14-ту добу кількість клітин зменшувалася до $21,5 \pm 1,2\%$ ($P < 0,05$) і на 21-шу добу знову підвищувалася в 1,7 рази ($P < 0,05$). Кількість моноцитів також мала хвильову динаміку. Максимальну кількість ($11,5 \pm 0,6\%$) спостерігали на 7-му добу, на 14-ту добу виявили зниження в 3,8 рази ($P < 0,05$) із подальшим зростанням на 21-шу добу до $8,5 \pm 0,42\%$.

Для виявлення можливих зв'язків і вивчення взаємопов'язаних процесів та можливих механізмів їх регуляції проведено кореля-

ційний аналіз показників (рис. 4). Наводимо лише існуючі кореляції. Виявлено лінійний кореляційний зв'язок вмісту NF- κ B та кількості зрілих гранулоцитів кісткового мозку ($r = 0,739$; $P < 0,01$); кількістю нейтрофілів і моноцитів периферичної крові ($r = 0,805$; $P < 0,01$); вмісту VEGF-A та FLT-1 ($r = 0,866$;

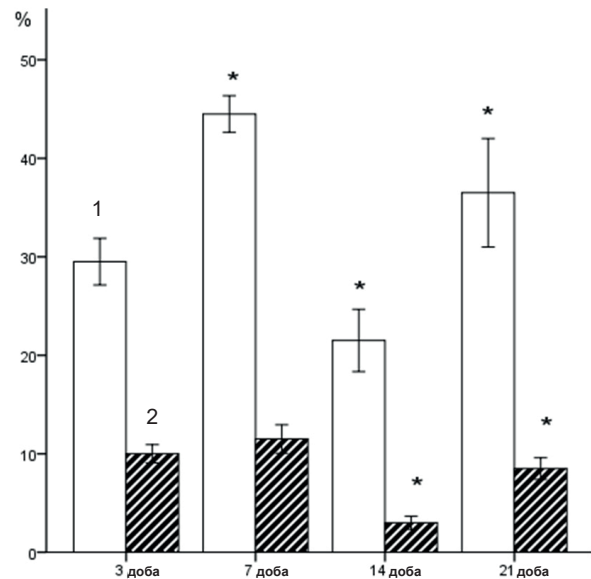


Рис. 3. Відносна кількість клітин периферичної крові в динаміці загоєння опікової рани (3, 7, 14, 21-ша доба): 1 – нейтрофіли, 2 – моноцити. * $P < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження

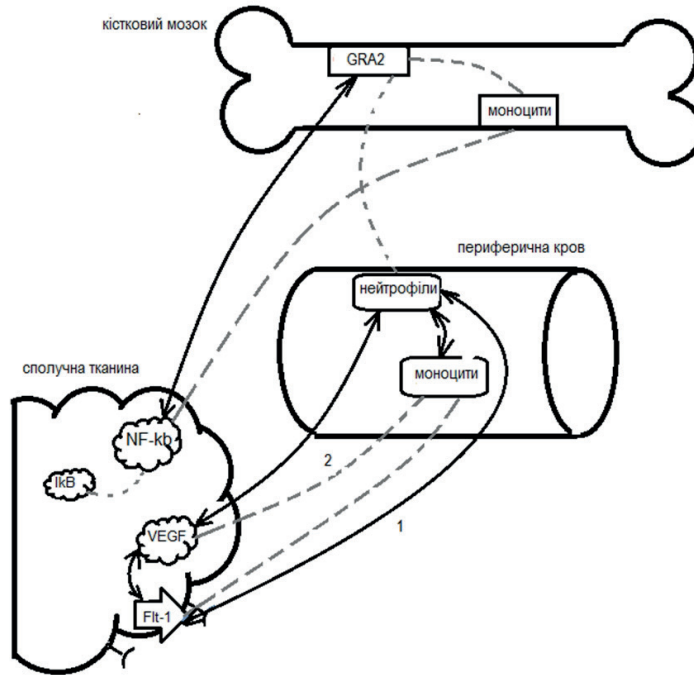


Рис. 4. Схема взаємозв'язків різних рівнів регуляції (сполучна тканина, кістковий мозок, периферична кров) через молекулярні маркери-цитокіни та клітинні пули в динаміці загоєння опікової рани. Протеїни NF-κB, ІκB-α, VEGF, FLT1 в регенераті сполучної тканини шкіри щурів, GRA2 – зрілі гранулоцити кісткового мозку. 1 – суцільна лінія – високий прямий кореляційний зв'язок між показниками, 2 – пунктирна лінія – відсутність зв'язку між показниками

$P < 0,01$); вмісту VEGF-A і нейтрофілів ($r = 0,708$; $P < 0,01$); вмісту FLT-1 та нейтрофілів ($r = 0,472$; $P < 0,05$).

Треба зауважити, що в роботі ми не наводимо результати щодо динаміки кількості клітин сполучнотканинного регенерату, яку ми досліджували в наших попередніх роботах [12], але для обговорення можливої ролі клітинних елементів регенерату рани як джерела експресії VEGF-A, ми визначили зворотний кореляційний зв'язок VEGF-A та тканинних нейтрофілів ($r = -0,454$; $P < 0,01$). Між VEGF-A та кількістю тканинних макрофагів кореляції не виявлено.

ОБГОВОРЕННЯ

Раніше ми вивчали особливості загоєння опікової рани щурів за допомогою патоморфологічних, гістохімічних, електронно-мікроскопічних досліджень за фізіологічних умов та на тлі некоригованої гіперглікемії.

Були показані кількісні зміни клітин у сполучнотканинному регенераті та особливості реакцій енергетичного метаболізму [13]. Під час репаративної регенерації послідовність інфільтрації сполучної тканини різними видами лейкоцитів відбувалася за класичним сценарієм, але з кількісним переважанням у групі тварин без соматичної патології, що вказує на зменшення реактивності крові за умов глікемії [14]. За умов гіперглікемії збільшувалася кількість клітин запальної інфільтрації та зменшувалася кількість фібробластів, особливо через 7 діб після нанесення опікової травми. Але для вивчення механізмів міжклітинної взаємодії важливе значення має дослідження експресії регуляторних цитокінів у пошкодженій ділянці та їх зв'язок із динамікою показників, які забезпечують увесь алгоритм ефективної репарації тканини.

Дослідження вмісту в сполучнотканинному регенераті NF-κB при загоєнні опіко-

вої рани відображає логічні зміни у вигляді підвищення його вмісту на 3-тю добу, зменшення на 7-му добу і потім знову поступового зростання. Така динаміка показника відображає логічний шлях регуляторного сигналу, який реалізується дією некротичних продуктів опікової рани, активацією DAMP-стимулювання, індукцією ФНП- α , і відображає прозапальний ефект NF- κ B [1]. Сигнал на 7–14-ту добу надходить до ядра, вмикає транскрипцію і синтез індукцибельних протеїнів, а в цей час концентрація NF- κ B знижується. Надалі у процесі загоєння рани (на 21-шу добу) підвищувалась експресія NF- κ B, що може бути свідченням активації неоваскуляризації на пізніх стадіях загоєння, враховуючи паралельне підвищення вмісту VEGF-A. На сьогодні активно вивчається регуляторна роль І κ B [2], остаточно не визначена різниця споріднених α - та β -кіназ, які фосфорилують білки І κ B, що призводить до їх деградації та подальшої активації гена NF- κ B. Показано, що макрофаги з дефіцитом І κ B кінази- β ІКК β мали підвищену експресію іNOS та ІЛ-12, що є ознаками «класичної» активації макрофагів, або М1-фенотипу [14]. Відсутність на макрофагах з дефіцитом ІКК β -рецептора ІЛ-4 (CD124) свідчить про втрату здатності реагувати на ІЛ-4 та розвивати протизапальний фенотип М2. Таким чином показано, що ІКК β пригнічує прозапальний М1-фенотип і сприяє переключенню на протизапальний М2-фенотип макрофагів [4].

За результатами наших досліджень, вміст І κ B- α у сполучнотканинному регенераті при загоєнні опікової рани на початку спостереження практично відсутній, що можна пояснити значно підвищеною експресією ФНП- α у цей період, яка сприяє убіквітинізації І κ B у протеосомах. Підвищення вмісту І κ B на 14-ту добу гальмує прозапальний вплив NF- κ B та експресію відповідних факторів, які знаходяться під його контролем, наприклад ФНП- α . На 21-шу добу гальмується І κ B-сигналінг, вміст NF- κ B підвищується і, вірогідно, NF- κ B-транскрипція переключається на

забезпечення протекторних функцій тканин, наприклад лімфогенезу.

Аналіз клітин кісткового мозку щурів у динаміці загоєння опікової рани виявив коливання кількості зрілих гранулоцитарних нейтрофілів, у вигляді підвищення на початку загоєння опікової рани зі зниженням на 7-му добу, що вірогідно пов'язаною із інтенсивним виходом клітин у периферичну кров до вогнища. Отже, в нормі при виникненні рани в сполучній тканині на 7-му добу в кістковому мозку виникає функціональний перерозподіл кількості клітинних елементів уже на рівні загальних попередників СМР/CLP: кількість мієлоїдних попередників зменшується, а лімфоїдних відповідно збільшується. Вважаємо, що це пов'язане зі зменшенням проліферації та підвищенням активності диференціювання клітин у цей період для підготовки виходу зрілих нейтрофілів та моноцитів у периферичну кров [13]. Вже на 14-ту добу СМР/CLP-показники повертаються до вихідних значень. За нашими результатами, до 3-ї доби активно диференціюються гранулоцити та моноцити, а на 7-му, навпаки, цих клітин визначається найменша кількість, а підвищується відносна кількість еозинофілів та базофілів. За нашими попередніми даними, активація проліферації та дозрівання клітин мієлоїдного згустка супроводжується відносним зменшенням у кістковому мозку елементів еритроїдного походження у всі терміни спостереження, але їх функціональна здатність і насиченість гемоглобіном при цьому залишається нормальною. Вірогідно такий перерозподіл відображає регуляцію відтворення клітин у кістковому мозку для їх виходу в периферичний кровотік та подальшої участі в процесі регенерації сполучної тканини для забезпечення успішного фізіологічного загоєння.

Висока кореляція зрілих гранулоцитів із NF- κ B дає підставу вважати, що функціональні зміни в кістковому мозку відбуваються за наявності гуморального сигналу у вигляді G-CSF, підвищення сироваткової концентра-

ції якого наведено в праці Gardner і співавт. [8]. Ми можемо припустити, що тригером цього сигналу з вогнища є транскрипційна активність NF- κ B, яка призводить до експресії факторів росту, що також описано Ambrozova і співавт. [2]. Більше того, відсутність кореляції вмісту NF- κ B із CMP і GRA1 – також дає можливість вважати, що активація NF- κ B впливає саме на кінцеву диференціацію гранулоцитів.

Поглиблене вивчення нейтрофілів показує, що їх роль у тканині є залежною від ситуації, чи стають вони тригером запальної реакції, чи залучаються до інших процесів тканинного середовища. Нині чітко не з'ясовані основні медіатори, які запускають перетворення від фізіологічного відновлення та регенерації тканин до патологічного пошкодження тканин та хронічних захворювань і яким чином регулюються ці процеси [10]. Відомі три стратегії, котрі можуть бути прийняті нейтрофілами для відновлення пошкодженої тканини. По-перше, завдяки фагоцитарній активності, нейтрофіли здатні видаляти тканинний дебрис на місці пошкодження. По-друге, нейтрофіли виділяють понад 700 протеїнів, що зберігаються в їх гранулах, серед яких фактори росту та проангіогенні фактори [16]. По-третє, фагоцитоз апоптотичних нейтрофілів макрофагами призводить до вивільнення протизапальних та репаративних цитокінів, таких як трансформуючий ростовий фактор β – TGF β (англ. transforming growth factor beta,) та IL-10, що ініціює програму ремоделювання тканин [17].

Дослідники вважають нейтрофіли продуцентами індукторів ангіогенезу при фізіологічному загоєнні рани [12, 18]. Так, у місці ішемізованої тканини, експериментально був ідентифікований циркулюючий пул нейтрофілів з проангіогенними властивостями, який потрібен для ефективного відновлення ангіогенезу [19]. Це дослідження демонструє не тільки нову підгрупу нейтрофілів, але й наявність регуляторних механізмів, які забезпечують рекрутування цієї клітин-

ної популяції до сайтів гіпоксії. Цікаво, що експресія рецепторів FLT1 була виявлена на нейтрофілах (CD49d+) людини та миші, що раніше не було показано. Це підтверджує концепцію, що нейтрофіли можуть бути специфічно активовані VEGF-A, виділеним з гіпоксичних ділянок. Експресія FLT1 та CD49d на підгрупі нейтрофілів вірогідно має вирішальне значення для таргетного орієнтування цих клітин (проангіогенних нейтрофілів) в зони ураження для модифікації ангіогенезу [19]. За нашими спостереженнями, вміст ендотеліального фактора VEGF-A в регенераті сполучної тканини під час загоєння рани відображає хвильову динаміку, яка знаходиться у кореляції із рецептором FLT1 і з вмістом нейтрофілів крові. Це дає змогу вважати, що до ангіогенезу, який активується при фізіологічній репарації сполучної тканини, активно залучені нейтрофіли крові, що надходять у вогнище через хемотаксис протягом усього часу відновлення тканини. І цей факт значною мірою підтверджується іншими дослідниками [20].

Оскільки, головним «диригентом» подій при загоєнні опікової рани є ядерний фактор NF- κ B, роль якого доведена як індуктора імунних реакцій запалення, а також у транскрипції факторів проліферації в кістковому мозку, зокрема G-CSF, можна припустити наявність різномірного регуляторного ланцюга на рівні «сполучна тканина – кістковий мозок – периферична кров» який виникає за нормальних фізіологічних умов. Так, NF- κ B індукуює продукцію факторів росту мієлоїдних попередників, гуморальний сигнал потрапляє до кісткового мозку, стимулює диференціювання нейтрофільних гранулоцитів та їх вихід у кров. Нейтрофіли, потрапляють до пошкодженої ділянки опікової рани, експресують ендотеліальні ростові фактори та регулюють експресію рецепторів до вказаних лігандів у сполучнотканинному регенераті, що сприяє відновленню регульованого ангіогенезу як важливого чинника своєчасної фізіологічної репарації.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

**Л.В. Натрус, І.М. Рижко, О.А. Лісаковська,
А.А. Тихомиров, Д.О. Лабудзинський,
Т.І. Панова**

РОЛЬ NF-κB В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И АКТИВАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ОЖОГОВОЙ РАНЫ КОЖИ КРЫС

Изучена взаимосвязь уровня экспрессии ключевых регуляторных протеинов провоспалительного профиля: ядерный фактор каппа В – NF-κB, его ингибиторной субъединицы – IκB-α, фактора роста эндотелия сосудов А – VEGF-A и эндотелиального рецептора FLT1 в регенерате соединительной ткани и изменением количества гранулоцитов костного мозга и нейтрофилов периферической крови в динамике (3, 7, 14, 21-е сутки) заживления ожоговой раны кожи крыс линии Вистар. Выявлена линейная корреляционная связь между динамикой продукции NF-κB и количеством гранулоцитов ($r = 0,739$; $P < 0,01$); между количеством нейтрофилов и содержанием VEGF-A ($r = 0,708$; $P < 0,01$); между содержанием FLT1 и VEGF-A ($r = 0,865$; $P < 0,01$); между количеством нейтрофилов и содержанием FLT1 ($r = 0,472$; $P < 0,05$). Полученные данные являются основанием представить разноразную регуляторную цепочку в системе соединительная ткань – костный мозг – периферическая кровь, которая возникает в нормальных физиологических условиях и является ключевым механизмом регуляции ангиогенеза. Вероятно, NF-κB активирует продукцию факторов роста миелоидных предшественников и регулирует дифференцировку гранулоцитов в костном мозгу; нейтрофилы из крови попадают в поврежденный участок ожоговой раны, секретируют эндотелиальные ростовые факторы и стимулируют в соединительнотканном регенерате экспрессию эндотелиальных рецепторов к указанным лигандам. Ключевые слова: регенерация кожи; рана; костный мозг; нейтрофилы; ангиогенез.

**L.V.Natrus¹, I.M. Ryzhko¹, O.O. Lisakovska²,
A.O.Tykhomyrov², D.O. Labudzinskyi²,
T.I.Panova³**

THE ROLE OF NF-κB IN THE DIFFERENTIATION AND ACTIVATION OF NEUTROPHILS DURING THE BURN WOUND HEALING OF THE SKIN IN RATS

We investigated the link between levels of key regulatory pro-inflammatory proteins (nuclear factor kappa B (NF-κB), its inhibitory subunit IκB-α), vascular endothelial growth-factor A (VEGF-A) and endothelial receptor FLT1) in a connective tissue regenerate and changes in bone marrow granulocyte and peripheral blood neutrophils counts during the skin burn wound healing (on the 3,7,14,21st day) in Wistar rats. It was detected a correlation between the NF-κB contents and the granulocytes count $r=0.739$ ($P < 0.01$); between the neutrophils count and the VEGF-A contents $r = 0.708$ ($P < 0.01$); between the FLT1 contents and the VEGF-A contents $r = 0.865$ ($P < 0.01$); between the neutrophils contents and the FLT1 contents ($r = 0.472$, $P < 0.05$). The obtained data provided the basis for formation of a hypothetical multi-level regulatory chain in the system of connective tissue - bone marrow - peripheral blood, appearing under the normal physiological condition and possible key mechanism of angiogenesis regulation. NF-κB probably activates the production of myeloid progenitor growth factors and regulates the differentiation of granulocytes in the bone marrow; neutrophils from the blood enter the damaged area of the burn wound, secrete endothelial growth factors and stimulate the expression of endothelial receptors to these ligands in the connective tissue regenerate.

Key words: skin regeneration, wound, bone marrow, neutrophils, angiogenesis.

¹Research Institute of Experimental and Clinical Medicine Bogomolets National Medical University, Kyiv;

²Palladin Institute of Biochemistry NAS of Ukraine, Kyiv;

³Bogomolets National Medical University, Kyiv;
Lnatrus777@gmail.com

REFERENCES

1. Pittman K, Kubes P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J Innate Immun.* 2013; 5:315-23.
2. Ambrozova N, Ulrichova J, Galandakova A. Models for the study of skin wound healing. The role of NRF2 and NF-KB. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2017;161(1):1-13.
3. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4).
4. Duran A, Diaz-Meco MT, Moscat J. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-κB transcriptional activation. *EMBO J.* 2003;22:3910-18.
5. Sun SC. The non-canonical NF-κB pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(9):545-58.
6. Lawrence T. The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a001651.
7. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *Int J Inflamm.* 2019;1(15):3706315.
8. Gardner JC, Noel JG, Nikolaidis NM, Karns R, Aronow

- BJ, Ogle CK, McCormack FX. G-CSF drives a posttraumatic immune program that protects the host from infection. *J Immunol.* 2014;192(5):2405-17.
9. Su Y, Richmond A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015;1;4(11):631-40.
10. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):531-9.
11. Gong Y, Koh DR. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res.* 2010;339:437-48.
12. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell.* 2006;13;124(1):175-89.
13. Kolesova NA, Natrus LV, Litvinenko VI, Sukhareva NM, Ryzhko IM. Dynamic of connective-tissue cell reactions of the skin of white rats with burn injury and persistent uncorrected hyperglycemia. *Med Sci Ukraine.* 2016;12(3-4):4-11.
14. Natrus L, Ryzhko I, Kozak A, Kryvosheieva O, Stechenko L. Ultrastructural base of the connective tissue skin' cells interactions at burn injury in the hyperglycemic white rats. *Svit Medytsyny ta Biol.* 2017;4(62):157-62.
15. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(12):953-64.
16. Dalli J, Montero-Melendez T, Norling LV, Yin X, Hinds C, Haskard D, Mayr M, Perretti M. Heterogeneity in neutrophil microparticles reveals distinct proteome and functional properties. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12:2205-19.
17. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:427-39.
18. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:159-75.
19. Massena S, Christoffersson G, Vågesjö E. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood.* 2015;22;126(17):2016-26.
20. Peiseler M, Kubes P. More friend than foe: the emerging role of neutrophils in tissue repair. *J Clin Invest.* 2019;129(7):2629-39.

Матеріал надійшов до редакції 28.05.2019