УДК 577.152.199

# Синтез окислов азота и связанных нитрозосоединений в иммунокомпетентных клетках при стафилококковой и грибковой инфекции

Р.Г. Камалян, Л.А. Аракелян, Н.Х. Алчуджян, И.С. Акопян, А.Г. Варданян, К.А. Гевондян, Н.О. Мовсесян

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятяна НАН РА*

*375014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

*Ключевые слова: Candida albicans, Staphylococcus aureus*, аргинин, кровь, лейкоциты, нитрозосоединения, окислы азота, синтаза оксида азота, тимус

При лечении любыми антимикробными препаратами в условиях подавления части нормальной бактериальной флоры устраняется конкуренция и происходит беспрепятственное размножение устойчивых к действию антибиотиков микроорганизмов, таких как *Candida albicans*, псевдомонады [4]. К ним можно причислить и стафилококк, возбудитель воспалительно-гнойных заболеваний кожных покровов слизистой и соединительной ткани и костей. Частота стафилококковых поражений обусловлена постоянным пребыванием этих микробов на коже, в протоках сальных и потовых желез, в волосяных мешочках, на слизистых оболочках, а также их широким распространением в окружающей среде. Инфицирование чужеродными микроорганизмами сопровождается воспалительным процессом, при этом токсины микробов, влияя на продукцию цитокинов, могут приводить к развитию иммунной супрессии и транзиторной иммунной недостаточности [9]. Иммунная недостаточность способствует развитию оппортунистической инфекции, в которой также не последнюю роль играют патогенная грамположительная бактерия *Staphylococcus aureus* и дрожжевой грибок *Candida albicans*.

Известно, что в ответ на инфекцию в организме повышается содержание провоспалительных цитокинов, интерлейкина-1β (IL-1β), фактора некроза опухоли-α (TNF-α), интерферона-γ (IFN-γ), которые в первую очередь стимулируют в нейтрофилах, моноцитах/макрофагах и лимфоцитах активность кальций-независимой "индуцибельной" синтазы оксида азота (iNOS), в результате чего продукция оксида азота (NO) значительно превышает базальный уровень [21, 25]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что L-аргининзависимый синтез NO, катализируемый iNOS, играет исключительно важную роль в антипатогенной реакции организма – активации бактериостатической и суицидной (апоптоз) программ клеток-мишеней [13]. Эндогенный NO и высокоактивные соединения азота, образующиеся в клетках хозяина в результате взаимодействия NO с супероксид анионом, углекислым газом и подобными соединениями, участвуют в эрадикации патогенов и препятствуют диссеминации инфекции – эти процессы реализуются при длительно поддерживаемой продукции NO, что становится возможным в условиях индуцированной экспрессии iNOS [7]. Поэтому одной из стратегий выживания патогенов является подавление активности iNOS, что вызывает снижение иммунитета и способствует развитию инфекции [1, 5].

Такие микроорганизмы, как *S. aureus* и *C. albicans*, выживающие благодаря их способности противостоять антимикробной защите макроорганизма, могут угнетать NO-зависимые механизмы иммунного ответа и антипатогенной защиты хозяина. Однако сведения, касающиеся их влияния на эндогенный синтез NO, противоречивы. Так, по данным одних авторов, убитые грибки и гифы *C. albicans* ингибируют секрецию IFN-γ высокоочищенными клетками естественных киллеров (NK), индуцируемую лигандами Toll-подобных рецепторов, липополисахаридом (ЛПС), зимозаном и NK-активирующими цитокинами (IL-2, IL-12 и IL-15) [22]. Снижение уровня IFN-γ будет вызывать падение активности iNOS и соответственно снижение продукции NO. Противоположные данные получены при изучении *in vitro* Т-клеточного ответа на системную *C. albicans*-инфекцию мышей, обработанных циклофосфамидом: выяснилось, что инфект стимулирует прайминг миелоидных прогениторов (Ly-6G(+)CD11b(+)), клеток, продуцирующих NO, посредством которого подавляется пролиферация Т-лимфоцитов и имеет место активная колонизация ими селезенки, но не лимфатических узлов, что повышает эффективность иммуносупрессивной терапии [12].

Липотейхоевая кислота, входящая в состав клеточной стенки *S. aureus*, тоже вызывает экспрессию iNOS в тканях хозяина [19]. Так, в мышиных макрофагах

эпителиальной линии J774.2. *S. aureus* индуцирует iNOS, вследствие синергического взаимодействия компонентов ее клеточной стенки, специфического фрагмента пептидогликана, N-ацетилглюкозамин-β-[1→4]-N-ацетилмурамил-L-аланин-D-изоглутамина, а также липотейхоевой кислоты, в результате чего повышается образование NO, который оказывает цитотоксическое действие, вызывая септический шок с множественными повреждениями [18]. Однако внутрибрюшинные инъекции *S. aureus* дефицитным по iNOS мышам (-/-) или нормальным мышам, получавшим до или после инфицирования ингибитор iNOS, аминогуанидин, вызывают сильный перитонит и высокую летальность [14]. Доказано, что осложненная рана характеризуется дефицитом NO, и в настоящее время для лечения гнойных ран успешно используется воздушно-плазменный поток NO [3]. Значительное ускорение заживления ран при применении NO-терапии отмечалось и в эксперименте, и клинике [26]. Причем резкое ускорение очищения ран от инфекции осуществляется благодаря прямому бактерицидному и бактериостатическому воздействию экзогенного NO и его опосредованному влиянию на продукцию NF-κB, цитокинов (IL-1, IL-8, TGF, TNF-α), регулирующих новоспалительные и иммунные реакции, пролиферацию фибробластов и ангиогенез [2].

Представленная работа посвящена выяснению молекулярных механизмов вирулентности *S. aureus* и *C. albicans* и их вклада в развитие иммунной недостаточности, связанных с влиянием этих микроорганизмов на уровень и продукцию NO и его метаболитов (окислов азота (ОА) и связанных нитрозосоединений (НС)) иммунокомпетентными клетками (ИКК) крови и тимуса крыс.

## Материал и методы

Исследования проводили на нелинейных самцах белых крыс массой 50–90 г (возраст 2–3 недели). Животные (n=20) были разделены на две группы: интактные крысы и крысы, получившие разовую внутрибрюшинную инъекцию 1 млрд смеси микробных клеток/мл (pH 7,4) клинических штаммов *S. aureus* и грибка *C. albicans*. Через 5 дней после инфицирования крыс декапитировали под легким эфирным наркозом, кровь и тимус забирали для дальнейшей обработки. В отдельном опыте использовался объединенный биоматериал двух крыс из каждой группы.

*Выделение ИКК крови и тимуса.* Из крови, стабилизированной антикоагулянтом (5% раствор $Na_2$-EDTA, приготовленный на 0,9% NaCl), осаждали эритроциты 6% декстраном в течение 1ч при 37°C. Взвесь лейкоцитов разводили в 20 мМ HEPES буфере, pH 7,4 (в соотношении 1:1), наслаивали на разделяющую среду и выделяли нейтрофилы и мононуклеары с учетом видовых различий их плотностей у крыс (1,129 и 1,087 г/см$^3$ соответственно) [8]. Выделение мононуклеаров и нейтрофилов крови и тимуса осуществлялось в двуступенчатом градиенте плотности фиколверографина в режиме центрифугирования 3000 об/мин 30 мин. Клетки, отобранные из верхнего интерфазного кольца (мононуклеары) и нижнего (нейтрофилы), промывали 20 мМ HEPES буфере, pH 7,4. Мононуклеарную фракцию инкубировали в течение часа при 37$^0$ C, и лимфоциты отделяли от моноцитов, селективно адгезированных на пластике. Моноциты смывались с плашек 0,02% EDTA после инкубации в течение 15 мин при 37$^0$C.

Тимус промывали на льду охлажденным 20 мМ HEPES буфером, содержащим 1мМ EDTA, 2мМ дитиотреитол и 3 мМ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, pH 6,88, измельчали ножницами и гомогенизировали вручную в том же буфере (в соотношении 1:10). Полученную взвесь оставляли на 30 мин в ледяной бане, и после оседания клеточных агрегатов из супернатанта выделяли ИКК тимуса центрифугированием в градиенте плотности и последующими процедурами так же, как ИКК крови.

Полученные клетки промывались трижды в 20 мМ HEPES буфере, pH 7,4, и после центрифугирования 10 мин при 3000 об/мин на том же буфере приготовливались суспензии ИКК крови и тимуса, которые использовались для анализа.

*Определение активности NOS.* Суспензии ИКК тимуса и крови ($10^6$ клеток/мл) инкубировали в течение 20 ч в реакционной смеси (конечный объем 1,5 мл): 20 мМ HEPES буфер, pH 7,4, содержащий 2мМ дитиотреитол, 1 мМ EDTA, 3 мМ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; кофакторы NOS: 1,2 мМ NADPH, 50 мкМ (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина, 5 мкМ FAD, 5 мкМ FMN, и субстрат – 7,5 мМ L-аргинина. В пробы для определения кальцийзависимой активности NOS вводили 1,25 мМ $CaCl_2$. Активность NOS определяли по L-аргнининзависимой продукции ОА и НС в процессе долговременной инкубации ИКК и выражали в нмоль нитрит-анионов $\cdot 10^{-6}$ клеток $\cdot 20$ ч$^{-1}$.

*Определение окислов азота и нитрозосоединений.* После предварительного осаждения белков 0,5N NaOH и 10% $ZnSO_4$, в супернатантах проб определяли концентрацию ОА (NO, $NO_2^-$, $NO_3^-$, $N_2O_4$, $N_2O_3$) и НС (нитрозотиолы и нитрозамины) неспецифической реакцией диазотирования реактивом Грисса-Илосвая спектрофотометрическим методом при длине волны 546 нм и выражали в нмоль нитрит-анионов $\cdot 10^{-6}$ клеток [27].

*Определение L-аргинина и L-цитруллина.* Щелочной безбелковый экстракт (0,2 мл) разводили в 1 мл дистиллированной воды, добавляли 0,5 мл смеси растворов (0,02% 8-оксихинолин в 96% этиловом спирте; 2,5% сульфосалицилат натрия в 0,01 М глициновом буфере; 2,5% NaOH; в пропорции 1:1:1) и 0,1 мл 1%

гипобромита натрия (приготовленного на 2,5% NaOH) и после тщательного перемешивания через 15 мин спектрофотометрически определяли содержание L-аргинина при длине волны 525 нм [10]. Количественный анализ L-цитруллина осуществлялся с использованием тест-набора Био-Ла-тест (La Chema, Чехия).

*Статистическая обработка результатов.* Статистическая значимость данных и сравнение групповых различий оценивались по *t*-критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

У больных с выраженной иммунной недостаточностью были выделены антибиотикрезистентная инвазивная L-форма *S. aureus* (получена от больной с токсоплазмозом) и грибка *C. albicans* (агрессивная форма, полученная от ВИЧ-инфицированной больной). Внутрибрюшинная одноразовая инъекция смеси вышеуказанных микроорганизмов молодым самцам вызывала через 5 дней заметные сдвиги в уровне ОА и связанных НС и в их L-аргининзависимой продукции в ИКК тимуса и крови по сравнению с контрольными животными (рис. 1–3). Отметим, что гидроксиламин, закись азота, ион нитрозония, нитрозотиолы в небольших количествах образуются в процессе NO-синтазной реакции и определяются реакцией Грисса [23].

У инфицированных крыс резко падал уровень ОА и НС во всех ИКК крови, а также в нейтрофилах и моноцитах тимуса, в которых он снижался значительно больше, чем в нейтрофилах и моноцитах крови. В то время как в ИКК крови наибольшее падение было зафиксировано в лимфоцитах, полностью противоположная картина наблюдалась в лимфоцитах тимуса инфицированных крыс: в них концентрация ОА и НС была более чем в 5 раз выше по сравнению с нормаль-

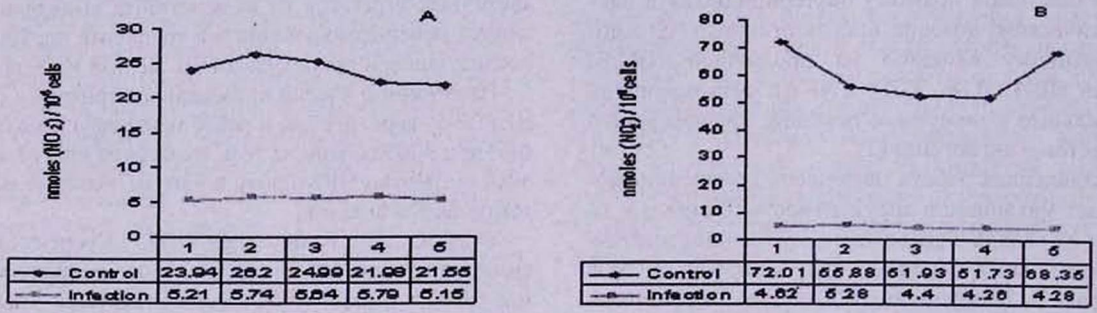


Рис. 1. Влияние инфекции *S. aureus* и *C. albicans* на содержание и L-аргининзависимую продукцию ОА и НС в нейтрофилах крови (А) и тимуса (В): 1 – до инкубации; 2 – после инкубации (- $Ca^{2+}$, - L-Arg и кофакторы NOS); 3 – после инкубации (+ $Ca^{2+}$, - L-Arg и кофакторы NOS); 4 – после инкубации (- $Ca^{2+}$, + L-Arg и кофакторы NOS); 5 – после инкубации (+ $Ca^{2+}$, + L-Arg и кофакторы NOS)

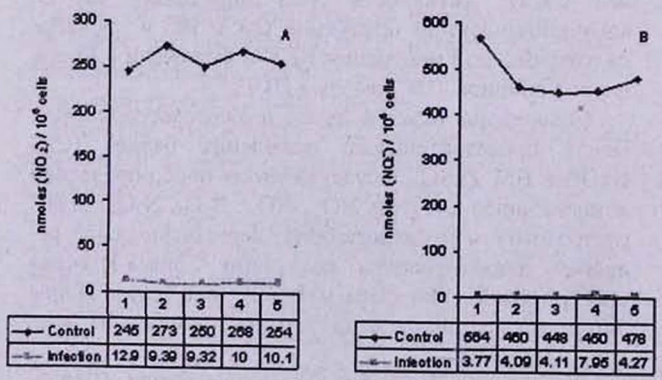


Рис. 2. Влияние инфекции *S. aureus* и *C. albicans* на содержание и L-аргининзависимую продукцию ОА и НС в моноцитах крови (А) и тимуса (В). Остальные обозначения те же, что к рис.1

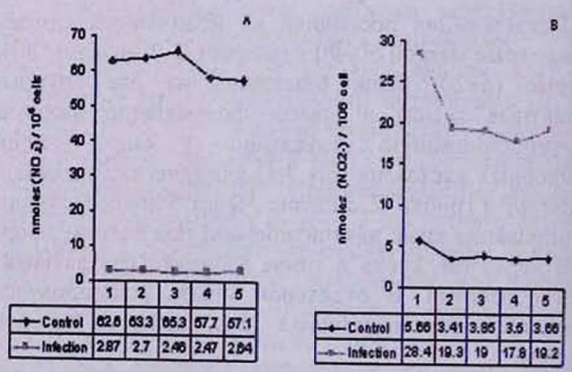


Рис. 3. Влияние инфекции *S. aureus* и *C. albicans* на содержание и L-аргининзависимую продукцию ОА и НС в лимфоцитах крови (А) и тимуса (В). Остальные обозначения те же, что к рис.1

ными лимфоцитами тимуса. По-видимому, при инфек- ции у крыс в тимусе в лимфоцитарном звене защиты эзлеет место компенсаторное активирование процес- в эндогенного синтеза ОА и НС, но при поступле- ии лимфоцитов в кровоток они подавляются, что, в тстности, может быть обусловлено изменением окру- ающей среды. Полученные результаты совпадают с нными других авторов, что дикий штамм *C. albicans* фифообразующий) *in vitro* подавляет синтез NO через прессию тотальной продукции iNOS и ее ферментативной активности в ЛПС- и IFN-γ-стимулированных ритонеальных макрофагах мышей, вызывая их пооптическую гибель [24]. Ранее сообщалось о корреляции между продукцией NO перитонеальными нейтрофилами крыс и их киллингом C. albicans в условиях *in vitro* [15]. По всей видимости, подавление активности NOS в ИКК крови и тимуса лежит в основе вызывания *C. albicans* в макроорганизме. При этом совместная инфекция *C. albicans* и *S. aureus* показала, что способность S. aureus индуцировать активность NOS [18, 19] подавляется более мощным ингибирующим воздействием *C. albicans*.

Долговременная инкубация ИКК как в отсутствие аргинина и кофакторов NOS, так и при их наличии в акционной смеси влияла на содержание ОА и НС в ИКК крови и тимуса, но и в этом случае инверсии в отношении их уровня у здоровых, и у инфицированных крыс в течение долговременной инкубации не происходило, и в основном сохранялась картина, одная с таковой до инкубации. Причем в процессе кубации во всех ИКК крови и в моноцитах тимуса фицированных крыс продукция этих соединений нижалась, а в нейтрофилах и лимфоцитах тимуса вышалась. Вероятно, метаболический путь L-нин – NO вносит основной вклад в эндогенную одукцию ОА и НС в ИКК крови и в норме, и при фицировании *S. aureus* и *C. albicans*. Подобная зависимость была показана в ряде тканей крыс (мозг, чки, сердце, легкие, печень, ЖКТ) в нормальных овиях [28]. В ИКК тимуса, возможно, функционируют альтернативные пути синтеза ОА и НС. Эндогенная продукция ОА и НС (в отсутствие субстрата и факторов NOS) возрастала у контрольных крыс в ИКК крови, тогда как в тимусе она заметно снижалась. У инфицированных крыс в ИКК крови она повышалась только в нейтрофилах и снижалась в моноцитах и лимфоцитах, в то же время нейтрофилы и моноциты тимуса при инкубации повышали уровень ОА и НС, а в лимфоцитах он снижался, но и в этом случае в раза превышал таковой контрольных крыс. Следует отметить, что концентрация ОА значительно зависит от содержания в окружающей среде активных форм кислорода (АФК). При инфекции генерация АФК иммунными клетками усиливается и NO активно взаимодействует с ними, в частности с супероксид-анионом с образованием мощного окислителя, пероксинитрита (ONOO-), который более стабилен при нейтральной и щелочной реакции среды. Следует отметить, что изучение продукции ОА и НС клетками крови и тимуса проводилось в условиях, приближенных к интактным, то есть при слабощелочном, очень близком к нейтральному pH 7,4, который соответствует активной реакции крови, и вероятность образования ONOO- из NO при долговременной инкубации ИКК в такой среде возрастает. Подобное снижение концентрации NO вследствие образования ONOO- было продемонстрировано в отношении ЛПС-активированных гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов периферической крови человека, при их долговременной инкубации (24 ч) [16]. Так, нейтрофилы человека в течение 24 ч утилизируют примерно 3 мкмоль экзогенного NO/млн клеток, превращая его в ONOO- [20].

Как видно из экспериментальных данных, введение L-аргинина и кофакторов NOS в реакционную смесь снижало у контрольных крыс продукцию ОА и НС при pH 7,4 всеми ИКК крови и нейтрофилами и моноцитами тимуса, (исключение составляли только лимфоциты тимуса). Это, по-видимому, свидетельствует об активировании в условиях избытка L-аргинина других L-аргининметаболизирующих систем, характеризующихся более низким сродством к субстрату, чем NOS. К ним относятся прежде всего аргиназа и аргининдекарбоксилаза, которые продуцируют мочевину и агматин, являющиеся ингибиторами изоферментов NOS [6]. Ранее нами было показано, что при более низких pH (7,0 – 7,2) активность NOS ИКК крови, тимуса и селезенки возрастает, что, в частности, связано со снижением активности ферментов, утилизирующих L-аргинин. Проявление активности NOS в ИКК зависит от метаболической ситуации, которая изменяется при инфицировании, что отражается на генерировании ОА и НС. Введение L-аргинина и кофакторов NOS в инкубационную среду вызывает возрастание активности NOS в моноцитах тимуса, а также в нейтрофилах и моноцитах крови, но не компенсирует наблюдаемое снижение уровня ОА и НС.

Известно, что кальций необходим и для активирования кальцийзависимых изоформ NOS, кроме того он необходим и для iNOS, которая проявляет лишь относительную зависимость от кальция [11].

Так, ЭДТА, связывающий кальций, и трифторперазин, антагонист кальмодулина (один из кофакторов NOS), снижают активность iNOS человека на 50 - 55 %, поскольку для обеспечения оптимального связывания этого изофермента с кальмодулином требуется небольшое количество кальция [17]. Однако кальций в применяемой нами системе (при pH 7,4) часто снижал показатели продукции ОА и НС, что, возможно, связано с активированием им продукции иммунными клетками крови и тимуса АФК, которые, активно взаимо-

действуя прежде всего с NO, снижают уровень ОА и НС. Влияние кальция зависело от наличия L-аргинина и кофакторов NOS в реакционной смеси и изменялось при инфекции, но и он не вызывал существенных изменений в интенсивности продукции ОА и НС в ИКК *in vitro*.

Таким образом, совместная инфекция *C. albicans* и *S. aureus* вызывает выраженное подавление уровня и продукции ОА и НС в ИКК крови и нейтрофилах и моноцитах тимуса при возрастании ее в лимфоцитах тимуса, которое тем не менее не компенсирует общего падения содержания ОА и НС в крови. Нарушение NO-зависимых механизмов иммунного ответа хозяина, по всей видимости, лежит в основе вирулентности грибковой и стафилококковой инфекции, на этом фоне вероятность развития иммунной недостаточности повышается, а в случае оппортунистической инфекции может еще больше осложнять состояние больного.

*Поступила 10.07.06*

## Ազոտի օքսիդների եւ կապված նիտրոզամիացությունների սինթեզը իմունակոմպետենտ բջիջներում ստաֆիլոկոկային եւ սնկային վարակի ժամանակ

Ռ.Գ. Քամալյան, Լ.Ա.Առաքելյան, Ն.Խ. Ալչուջյան, Ի.Ս. Հակոբյան, Ա.Գ. Վարդանյան, Կ.Ա. Ղևոնդյան, Ն.Հ. Մովսեսյան

Իմունային անբավարարությամբ տառապող հիվանդներից անջատված Candida albicans-ի և Staphylococcus aureus-ի բջիջների խառնուրդը ներարկվել է առնետներին, և 5 օր անց այդ կենդանիների իմունակոմպետենտ բջիջներում ուսումնասիրվել է ազոտի օքսիդների (NOx) և կապված նիտրոզամիացությունների (ՆՄ) մակարդակը և արտադրությունը երկարատև ինկուբացիայի պայմաններում: Վարակված առնետների արյան նեյտրոֆիլներում, մոնոցիտներում և լիմֆոցիտներում և ուրցագեղձի նեյտրոֆիլներում ու մոնոցիտներում գրանցվել է NOx և ՆՄ մակարդակի և նրանց արգինին-կախյալ արտադրության կտրուկ անկում, հակառակ պատկեր է դիտվել ուրցագեղձի լիմֆոցիտներում՝ այդ միացությունների զգալի աճ, համեմատած առողջ կենդանիների հետ: Այսպիսով պարզվել է, որ C. albicans և S. aureus կլինիկական շտամների միասնական վարակը ճնշում է NO-կախյալ մանրէասպան մեխանիզմները առնետի իմունակոմպետենտ բջիջներում, բացառությամբ ուրցագեղձի լիմֆոցիտների և, թուլացնելով իմունային բջիջների ներբջջային քիլինգի կարողությունը, մասամբ պատասխանատու է իմունային անբավարարության ուժգնության և ելքի համար:

## Nitrogen oxides and related nitrosocompounds synthesis by immunocompetent cells during staphylococcal and fungal infection

R.G. Kamalyan, L.A. Arakelyan, N.Kh. Alchujyan, I.S. Hakobyan, A.G. Vardanyan, K.A. Gevondyan, N.H. Movsesyan

Rats were injected intraperitoneally with mixture of clinical strains of Candida albicans and Staphylococcus aureus isolated from patients with immunodeficiency. Five days after treatment both the level and the L-arginine-dependent production of nitrogen oxides (NOx) and related nitrosocompounds (NC) by neutrophils, monocytes and lymphocytes from blood and neutrophils and monocytes from thymus of rats infected decreased drastically, as compared to control rats. Contrary to it, the level and L-arginine-dependent production of NOx and NC increased markedly in thymic lymphocytes. The data obtained suggest that the infection with C. albicans and S. aureus suppresses the NO-dependent microbicidal mechanism in most of immunocompetent cells of rat, with exception for thymic lymphocytes, and these microorganisms are partly responsible for the severity and outcome of immunodeficiency possibly by inducing impairment of the intracellular killing capacity of immune cells.

## Литература

1. *Брюне Б., Сандау К., фон Киетен А.* Апоптическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути. Биохимия, 1998, т. 63, 7, с. 966–975.

2. *Дуванский В.А., Толстых М.П., Петрин С.А., Троицкая О.С., Кривцхин Д.В.* Фотодинамическая терапия и экзогенный оксид азота в комплексном лечении гнойных ран мягких тканей. Хирургия, 2005, 10, с. 59 – 62.
3. *Кабисов Р.К., Соколов В.В., Шехтер А.Б.* Опыт применения экзогенной NO-терапии для лечения послеоперационных ран и лучевых реакций у онкологических больных. Рус. онкол. журн., 2000, т.1, с. 24 – 29.
4. *Лоуренс Д.Р., Беннет П.Н.* Клиническая фармакология. М., 2002, с. 680.
5. *Маеда Х., Акаике Т.* Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке. Биохимия, 1998, т. 63, 7, с. 1007 – 1019.
6. *Недоспасов А.А.* Биогенный NO в конкурентных отношениях. Биохимия, 1998, т. 63, 7, с. 881 – 904.
7. *Проскуряков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И., Скворцов В.Г.* Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций. Иммунология, 2000, 4, с. 9 – 20.
8. *Фрик Г., Прейснер З.С., Иенсен Г.Л., Бурмейстер Ю.* В кн.: Иммунологические методы/ Под ред. Х. Фримеля, М., 1979, с. 372.
9. *Яковлев М.Ю.* Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека. Физиол. человека, 2003, т. 29, 4, с. 98 – 109.
10. *Akamatsy S., Watanabe T.J.* L-arginine determination in biological liquids, J. Biochem., 1961, v. 77, 3, p. 484.
11. *Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.* Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, Biochem. J., 2001, v. 357, 3, p. 593 – 615.
12. *Angulo I., Jimenez-Diaz M.B., Garcia-Bustos J.F., Gargallo D., de las Heras F.G., Munoz-Fernandez M.A., Fresno M. Candida albicans* infection enhances immunosuppression induced by cyclophosphamide by selective priming of suppressive myeloid progenitors for NO production, Cell Immunol., 2002, v. 218, 1 – 2, p. 46 – 58.
13. *Burgner D., Rockett K., Kwiatkowski D.* Nitric oxide and infectious diseases, Arch. Dis. Child., 1999, v. 81, p. 185 – 188.
14. *Crosara-Alberto D.P., Darini A.L., Inoue R.Y., Silva J.S., Ferreira S.H., Cunha F.Q.* Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by Staphylococcus aureus. Br. J. Pharmacol., 2002, v. 136, 5, p. 645 – 658.
15. *Fierro I.M., Barja-Fidalgo C., Cunha F.Q., Ferreira S.H.* The involvement of nitric oxide in the anti-Candida albicans activity of rat neutrophils, Immunology, 1996, v. 89, 2, p. 295 – 300.
16. *Gagnon C., Leblond F.A., Filep J.G.* Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes, lymphocytes challenged by lipopolysaccharide, FEBS Lett., 1998, v. 431, 1, p. 107 – 110.
17. *Geller D.A., Lowenstein C.J., Shapiro R.A.* Human inducible nitric oxide synthase requires calcium, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, v. 90, p. 3491 – 3495.
18. *Kengatharan K. M., De Kimpe S., Robson C., Foster S. J., Thiemermann C.* Mechanism of Gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure, J. Exp. Med., 1998, v. 188, 2, p. 305 – 315.
19. *Lonchampt M.O., Auguet M., Delaflotte S., Goulin-Schulz J., Chabrier P.E., Braquet P.* Lipoteichoic acid: a new inducer of nitric oxide synthase, J. Cardiovasc. Pharmacol., 1992, v. 20, Suppl. 12, S145 – S147.
20. *McBride A., Brown G.C.* Activated human neutrophils rapidly break down nitric oxide, FEBS Lett., 1997, v. 417, 2, p. 231 – 234.
21. *Morris S.M., Billiar T.R.* New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis, Am. J. Physiol., 1994, v. 266, E829 – E839.
22. *Murciano C., Villamon E., O'Connor J.E., Gozalbo D., Gil M.L.* Killed *Candida albicans* yeasts and hyphae inhibit gamma interferon release by murine natural killer cells, Infect. Immun., 2006, v. 74, 2, p.140 – 146.
23. *Schmidt H.H.W., Hoffman H., Schindler U., Shutenko Z.S.* Production of nitogene derivatives by nitric oxide synthase, Proc. Nutl. Acad, Sci. USA, 1996, v. 93, p. 14492–14497.
24. *Schroppel K., Kryk M., Herrmann M., Leberer E., Rollinghoff M., Bogdan C.* Suppression of type 2 NO-synthase activity in macrophages by Candida albicans, Int. J. Med. Microbiol., 2001, v. 290, 8, p. 659 – 668.
25. *Shi F.D., Flodstrom M., Kim S.H.* Control of the autoimmune response by type 2 nitric oxide synthase, J. Immunol., 2001, v. 167, p. 3000 – 3006.
26. *Stallmeyer B., Kampfer H., Kolb N.* The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible NO-synthase severely impairs wound reepitelization, J. Invest. Dermat., 1999, v. 113, 6, p. 1090 – 1098.
27. *Tracey W.R., Linden J., Peach M.J., Johns R.A.* Comparison of spectrophotometric and biological assays for nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor: non-specificity of the diazotization reaction for NO and failure to detect EDRF, J. Farm. Exp. Ther., 1989, v. 252, 3, p. 922 – 928.
28. Tuncel M., Dogrucol-Ak D., Erkassap N. Modified method for capillary electrophoresis to determine nitric oxide correlated nitrate in tissue homogenates. In: Nitric Oxide: Basic Research and Clinical Applications (R.J. Gryglewsky, P. Minuz, eds.), IOS press, Amsterdam–Berlin–Oxford–Tokyo–Washington DC, 2001, v. 317, p. 217 – 220.