

Цитокины и оксид азота при бронхиальной астме

Петровский Ф.И., Петровская Ю.А., Огородова Л.М., Серебров В.Ю.

Cytokines and nitric oxide in case of bronchial asthma

Petrovsky F.I., Petrovskaya Yu.A., Ogorodova L.M., Serebrov V.Yu.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Петровский Ф.И., Петровская Ю.А., Огородова Л.М., Серебров В.Ю.

Представлены современные данные о системе взаимосвязи ключевых цитокинов, регулирующих атопическое воспаление при бронхиальной астме, и оксида азота. Описаны эффекты интерлейкина-4 на синтез оксида азота. Приведены данные о влиянии оксида азота на синтез цитокинов и баланс Th1/Th2, нарушение которого лежит в основе реактивного иммунного ответа.

Ключевые слова: бронхиальная астма, оксид азота, цитокины.

Complex interactions between nitric oxide and cytokines of atopic inflammation are presented. The effects of interleukin-4 on nitric oxide synthesis, immunoregulatory properties of nitric oxide and its influence on Th1/Th2 balance are described.

Key words: bronchial asthma, nitric oxide, cytokines.

УДК 616.248-07

Оксид азота (NO) играет роль во многих физиологических процессах. Его синтез в эндотелиальных клетках в ответ на химические и физические стимулы поддерживает сосудистый тонус, участвуя в регуляции кровотока и давления [37]. Оксид азота, синтезируемый эндотелием и/или тромбоцитами, ингибирует агрегацию и адгезию их, адгезию лейкоцитов, и регулирует пролиферацию гладкомышечных клеток [37]. Действуя как нейромедиатор, NO участвует в процессах формирования памяти, болевой чувствительности, координации между нейрональной активностью и кровотоком [28, 37]. В периферической нервной системе NO является медиатором холинергической и неадренэргической систем, которые регулируют некоторые формы нейрогенной вазодилатации и определенные функции желудочно-кишечной, дыхательной и мочеполовой систем [11, 17, 37].

После того как было установлено, что уровень оксида азота в выдыхаемом воздухе больных бронхиальной астмой, бронхоэктатической болезнью значительно выше, чем у здоровых, определение выдыхаемого NO стало использо-

ваться как способ оценки активности воспаления и эффективности противовоспалительной терапии при бронхиальной астме [14, 16, 24, 38].

Появляется все больше данных о способности NO оказывать влияние на иммунную систему и воспалительный ответ. Оксид азота угнетает активность Th1-клеток и таким образом способствует развитию Th2-ответа, является мощным активатором хемотаксиса эозинофилов и нейтрофилов и угнетает апоптоз этих важнейших эффекторов атопического воспаления [2, 5, 10].

Оксид азота является продуктом 5-электронного окисления одного химического эквивалента гуанидинового азота L-аргинина ферментом NO-синтазой. Семейство NO синтаз (NO-C) состоит из трех основных изоформ. Выделенный из мозга Ca^{2+} -зависимый фермент (нейрональная NO-синтаза, nNO-C, тип I) в основном экспрессируется в центральной и периферической нервных системах, но также обнаружен в других тканях, таких как поперечнополосатые мышцы, *macula densa* и в плаценте. Эндотелиальная NO-синтаза (eNO-C, тип III), которая также является Ca^{2+} -за-

висимой, обнаруживается в клетках эндотелия сосудов. Индуцибельная изоформа (иNO-C; тип II) не присутствует постоянно, но синтезируется *de novo* в различных типах клеток, таких как макрофаги, гладкомышечные клетки, кардиомиоциты и клетки микроглии под действием воспалительных стимулов. Индуцибельная NO-синтаза, Ca^{2+} -независимая, является источником больших количеств NO, что требуется для киллинга бактерий, вирусов и других патогенов [13, 37].

Иммуногистохимические исследования показали присутствие всех трех изоформ в легких человека. Эндотелиальная NO-C локализована в эндотелии сосудов бронхов, эпителиальных клетках, нNO-C обнаружена в холинэргических и нехолинэргических/неадренэргических нервах бронхов, а также в эпителиальных клетках. Индуцибельная NO-синтаза может экспрессироваться в нескольких типах клеток в ответ на цитокины, эндотоксин, оксиданты. При бронхиальной астме индуцибельная NO-синтаза локализована преимущественно в эпителиальных клетках, макрофагах и эозинофилах [1, 12, 19].

Цитокины – стимуляторы синтеза NO при бронхиальной астме

В течение долгого времени вопрос об активаторах синтеза NO при бронхиальной астме оставался открытым. Основными кандидатами-индукторами считались комбинации двух и более провоспалительных цитокинов (ИНФ γ , ФНО α и ИЛ-1 β) и бактериальный эндотоксин [18, 32]. Исследование способности человеческих мононуклеарных клеток и моноцитов синтезировать NO показало, что ИЛ-4 является активным стимулятором синтеза оксида азота, причем ИНФ γ , неактивный один, оказывал дополнительное активирующее влияние [15, 21].

Продемонстрированный эффект зависел от межклеточных взаимодействий, происходящих в культуре мононуклеаров, так как на чистых моноцитах стимулирующее действие ИЛ-4 на базальный синтез NO проявлялось не всегда.

При продолжении исследований было установлено, что 75% проб моноцитов, взятых у раз-

ных доноров, спонтанно продуцируют малые количества NO, тогда как моноциты 25% доноров продуцируют относительно большие количества NO.

Оказалось, что ИЛ-4 способен активировать синтез NO только в культуре малопродуцирующих моноцитов и угнетает базальный синтез NO моноцитами, способными синтезировать большое количество нитритов [26, 29]. Эти данные указывают на то, что ИЛ-4 может быть как индуктором, так и ингибитором синтеза оксида азота моноцитами и его действие зависит от степени активации клеток-мишеней. Дальнейшие исследования показали, что ИЛ-4 способен приводить к незначительному повышению внутриклеточного цГМФ в покоящихся моноцитах. Это влияние угнеталось NG-монометил-L-аргинином – конкурентным ингибитором NO-C, кальциевым хелатором и ингибитором кальмодулина, что свидетельствует о возможной способности ИЛ-4 активировать конститутивную NO-C в покоящихся клетках.

Более высокие концентрации цГМФ в ответ на контакт с ИЛ-4 наблюдались в моноцитах, преактивированных ИНФ γ . Конкурентный ингибитор NO-C - NG-монометил-L-аргинин отменял эффект ИЛ-4, тогда как ингибитор кальмодулина и кальциевый хелатор не оказывали влияния на увеличение внутриклеточного цГМФ в преактивированных моноцитах, следовательно, в данном случае цитокин приводил к активации иNO-C [7,21]. Очевидно, что описанные эффекты ИЛ-4 требуют дальнейших глубоких исследований с применением иммуногистохимического анализа, селективных ингибиторов иNO-C, методов прямой оценки синтеза NO и изучения экспрессии мРНК NO-синтаз.

Другим кандидатом на роль индуктора синтеза NO является низкоафинный Fc ϵ II рецептор CD23 [20]. Было продемонстрировано, что активирующий эффект ИЛ-4 на синтез нитритов моноцитами периферической крови зависит от CD23 [27,30]. Так, моноклональные анти-CD23 Fab фрагменты приводили к значительному (до 70%) снижению синтеза нитритов ИЛ-4 активированными моноцитами. Внесение в культуру клеток рекомбинантного sCD23 приводило к активации синтеза нитритов моноцитами, который

угнетался конкурентным ингибитором NO-синтазы нитро-L-аргинином.

Преактивация моноцитов ИНФ γ приводила к усилению активности ИЛ-4 и CD23 зависимого синтеза нитритов, который также угнетался нитро-L-аргинином и анти-CD23 Fab. Таким образом, CD23 в мембраносвязанной и растворимой формах регулирует синтез NO моноцитами, а также, по меньшей мере, частично опосредует эффект ИЛ-4 на синтез оксида азота этими клетками. Очень важно отметить, что все описанные в этом исследовании реакции являются антиген-независимыми. Объяснением этого феномена стало открытие, что CD23 является лигандом для CD11b и CD11c, важных молекул межклеточной адгезии, активация которых приводит к целой цепи событий, включая NO-зависимый синтез провоспалительных цитокинов, таких как ФНО α [3,23].

В дальнейшем было установлено, что связывание CD23 моноклональными антителами приводит к активации синтеза мРНК иNO-C, и отмечена корреляция между уровнем экспрессии CD23 и активностью индуцибельной NO-C. Это указывает на возможную собственную роль данного рецептора (не только как лиганда для CD11) в стимуляции синтеза NO [9,31].

Влияние NO на регуляцию синтеза цитокинов

В самом начале исследований иммунологических эффектов оксида азота считалось, что NO обладает только антипролиферативным, цитостатическим действием. Действительно, в силу своих особенностей как свободнорадикальная молекула NO способен угнетать ферменты цепи переноса электронов и цикла Кребса, такие как аконитаза, НАДФН – убихинон оксидоредуктаза, сукцинат – убихинон оксидоредуктаза, а также глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа [28]. Однако в дальнейшем были обнаружены и описаны многие специфические иммуномодулирующие эффекты оксида азота. Оказалось, что оксид азота способен оказывать влияние на Th1/Th2-баланс, селективно угнетая Th1 [4].

Было показано, что NO ингибирует продукцию ИЛ2 и ИНФ γ Th1-клетками [6,25]. Оксид азота способен влиять на синтез провоспалительных цитокинов альвеолярными макрофагами, в зависимости от степени активации этих клеток, не оказывая влияния на базальный синтез ФНО α покоящимися моноцитами периферической крови, но ингибируя синтез ФНО α , ГМКСФ, ИЛ-1 β активированными моноцитами и альвеолярными макрофагами астматиков и здоровых доноров [8,34, 36].

Доноры NO, такие как нитропруссид натрия, увеличивают секрецию ИЛ-4, причем эффект является дозозависимым [33]. NO слабо усиливает активацию промотора гена ИЛ-4 и значительно угнетает индукцию промотора гена ИЛ-2, что связано с селективной инактивацией ядерного фактора каппа В в Т-клетках [28,35]. Видимо, влияние NO на активность транскрипционных факторов зависит от клеток-мишеней и, возможно, степени их активации, так как NO активирует ядерный фактор каппа В в альвеолярных макрофагах и связанный с этим синтез провоспалительных цитокинов [22]. Крайне важный для понимания роли NO в процессах атопии и наглядный эксперимент был проведен Xiong Y. и коллегами [39]. Было показано, что мыши с наследственным дефицитом иNO-C иначе реагируют на сенсibilизацию овальбумином, что выражается преимущественно в повышенном синтезе Т-клетками ИНФ γ , но не в снижении продукции ИЛ-4 и ИЛ-5. Тем не менее эти изменения реактивности иммунокомпетентных клеток приводят к значительной супрессии бронхиальной эозинофилии и бронхообструкции по сравнению с этими показателями здоровых животных.

Перечисленные эффекты NO на направленность иммунного ответа могут быть особенно интересны в контексте того, что ИЛ-4 активирует синтез оксида азота и, возможно, экспрессию иNO-C. Комплекс IgE-аллерген, возможно, также способен (через CD23) активировать синтез как ИЛ-4, так и NO. Образуется положительная обратная связь во взаимодействиях аллерген – ИЛ-4 – оксид азота, что может быть одним из факторов развития хронического воспаления с IgE-ответом.

Таким образом, не вызывает сомнения, что существует сложная система взаимодействия

оксида азота и ключевых цитокинов атопического воспаления, реализующаяся во взаимном влиянии на регуляцию синтеза при бронхиальной астме. Дальнейшее изучение этой системы позволит более точно раскрыть механизмы аллергического воспаления в воздухоносных путях и уточнить патогенетические аспекты атопической бронхиальной астмы.

Литература

1. *Constitutive* and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells / K. Asano, C.B. Chee, B. Gaston, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1994. V. 91. P. 10089.
2. *Ashutosh K.* Nitric oxide and asthma: a review // Curr. Opin. Pulm. Med. 2000. V. 6. < 1. P. 21–25.
3. *The 25-kDa soluble CD23* activates type III constitutive nitric oxide-synthase activity via CD11b and CD11c expressed by human monocytes / J.P. Aubry, N. Dugas, S. Lecoanet-Henchoz, et al. // J. Immunol. 1997. V. 159. < 2. P. 614–622.
4. *Barnes P.J., Liew F.Y.* Nitric oxide and asthmatic inflammation // Immunol Today. 1995. V. 16. P. 128.
5. *Berlyne G., Barnes N.* No role for NO in asthma? // Lancet. 2000. V. 355. P. 1029–1030.
6. *Nitric oxide* increased interleukin-4 expression in T lymphocytes / R.H. Chang, M.H. Feng, W.H. Liu, et al. // Immunology. 1997. V. 90. < 3. P. 364–369.
7. *Role of interleukin-4* in the regulation of nitric oxide production by normal human monocytes / M.C. Defer, B. Dugas, N. Paul-Eugene, et al. // C. R. Acad. Sci. III. 1994. V. 317. < 11. P. 1021–1025.
8. *Differential* regulation of human blood monocyte and alveolar macrophage inflammatory cytokine production by nitric oxide / C. Dinakar, A. Malur, B. Raychaudhuri, et al. // Ann. Allergy Asthma Immunol. 1999. V. 82. < 2. P. 217–222.
9. *Nitric oxide* production by human monocytes: evidence for a role of CD23 / B. Dugas, M.D. Mossalayi, C. Damais, et al. // Immunol Today. 1995. V. 16. < 12. P. 574–580.
10. *Nitric oxide* modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats / H.H. Ferreira, E. Bevilacqua, S.M. Gagioti, et al. // Eur. J. Pharmacol. 1998. V. 358. P. 253–259.
11. *Folkerts G., Nijkamp F.P.* Airway epithelium: more than just a barrier! // Trends Pharmacol. Sci. 1998. V. 19. P. 334–341.
12. *Gaston B., Kobzik L., Stamler J.S.* Distribution of nitric oxide synthase in the lung // Nitric oxide and the lung / W. Zapol, K. Bloch, editors. New York: Marcel Dekker, 1997. P. 75–86.
13. *Geller D.A., Billiar T.R.* Molecular biology of nitric oxide synthases // Cancer Metastasis Rev. 1998. V. 17. P. 7.
14. *Giner Munoz M.* Exhaled nitric oxide // Allergol. Immunopathol. 2000. V. 28. < 3. P. 124–135.
15. *Interferon gamma* and interleukin-4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators / F.H. Guo, K. Uetani, S.J. Haque, et al. // J. Clin. Invest. 1997. V. 100. P. 829–838.
16. *Gustafsson L.E.* Exhaled nitric oxide as a marker in asthma // Eur. Respir. J. Suppl. 1998. V. 26. P. 49S–52S.
17. *Janson L., Wiklund L.* Nitric oxide, nitrogen metabolism and inflammatory respiratory disease. An hypothesis. // Ups. J. Med. / Sci. 1997. V. 102. P. 21–33.
18. *Effects of TNF-alpha, IFN-gamma and IL-beta* on normal human bronchial epithelial cells / C. Kampf, A.J. Relova, S. Sandler, et al. // Eur. Respir. J. 1999. V. 14. < 1. P. 84–91.
19. *Nitric oxide synthase* in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization / L. Kobzik, D.S. Bredt, C.J. Lowenstein, et al. // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1993. V. 9. P. 371.
20. *Role of CD23* in NO production by human monocytic cells / J.P. Kolb, N. Paul-Eugene Dugas, K. Yamaoka, et al. // Res Immunol. 1995. V. 146. < 9. P. 684–689.
21. *Interleukin-4* stimulates cGMP production by IFN-gamma-activated human monocytes. Involvement of the nitric oxide synthase pathway / J.P. Kolb, N. Paul-Eugene, C. Damais, et al. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. < 13. P. 9811–9816.
22. *Nitric oxide* modulates interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis / H.P. Kuo, C.H. Wang, K.S. Huang, et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. (United States). 2000. V. 161. < 1. P. 192–199.
23. *CD23 regulates* monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b–CD18 and CD11c–CD18 / S. Lecoanet-Henchoz, J.F. Gauchat, J.P. Aubry, et al. // Immunity. 1995. V. 3. < 1. P. 119–125.
24. *Lemanske R.F., Jr.* Inflammatory events in asthma: an expanding equation // J. Allergy Clin. Immunol. 2000. V. 105. < 6 (Pt. 2). P. S633–S636.
25. *Lin C.C., Lin C.Y., Ma H.Y.* Pulmonary function changes and increased Th-2 cytokine expression and nuclear factor kB activation in the lung after sensitization and allergen challenge in brown Norway rats // Immunol. Lett. 2000. V. 73. P. 57–64.
26. *Heterogeneous* spontaneous and interleukin-4-induced nitric oxide production by human monocytes / G. Mautino, N. Paul-Eugene, P. Chanez, et al. // J. Leukoc. Biol. 1994. V. 56. < 1. P. 15–20.
27. *Involvement of Fc epsilon RII/CD23* and L-arginine-dependent pathway in IgE-mediated stimulation of human monocyte functions / M.D. Mossalayi, N. Paul-Eugene, F. Ouaz, et al. // Int. Immunol. 1994. V. 6. < 7. P. 931–934.
28. *Murad F.* Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling // J. Biosci. Rep. 1999. V. 19. N 3. P. 133–154.
29. *Heterogenous* nitrite production by IL-4-stimulated human monocytes and peripheral blood mononuclear cells / N. Paul-Eugene, J.P. Kolb, C. Damais, et al. // Immunol. Lett. 1994. V. 42. < 1–2. P. 31–34.
30. *Ligation of CD23* activates soluble guanylate cyclase in human monocytes via an L-arginine-dependent

- mechanism / N. Paul-Eugene, J.P. Kolb, M. Sarfati, et al. // *J. Leukoc. Biol.* 1995. V. 57. < 1. P. 160–167.
31. *Evidence for a role of Fc epsilon RII/CD23 in the IL-4-induced nitric oxide production by normal human mononuclear phagocytes* / N. Paul-Eugene, D. Mossalayi, M. Sarfati, et al. // *Cell. Immunol.* 1995. V. 163. < 2. P. 314–318.
32. *Human lung mononuclear cells induce nitric oxide synthase in murine airway epithelial cells in vitro: role of TNFalpha and IL-1beta* / R.A. Robbins, J.H. Sisson, D.R. Springall, et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997. V. 155. P. 268.
33. *Endogenous nitric oxide in allergic airway disease* / P.E. Silkoff, R.A. Robbins, B. Gaston, et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000. V. 105. P. 438–448.
34. *Taylor-Robinson AW* Counter-regulation of T helper 1 cell proliferation by nitric oxide and interleukin-2 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. V. 233. < 1. P. 14–19.
35. *Nitric oxide and asthma* / N.H. Hacken, W. Timens, T.W. van der Mark, et al. // *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* 1999. V. 143. < 31. P. 1606–1611.
36. *Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages* // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1997. V. 17. < 3. P. 279–283.
37. *Vallance P., Collier J.* Fortnightly Review Biology and Clinical Relevance of nitric oxide // *BMJ.* 1994. V. 309. P. 453–457.
38. *Nitric oxide in the lung: therapeutic and cellular mechanisms of action* / B. Weinberger, D.E. Heck, D.L. Laskin et al. // *Pharmacol. Ther.* 1999. V. 84. N 3. P. 401–411.
39. *Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2* / Y. Xiong, G. Karupiah, S.P. Hogan, et al. // *J. Immunol.* 1999. V. 162. < 1. P. 445–452.

Поступила в редакцию 1.08.2001 г.