

УДК 612.015.3:546.215

АБАТУРОВ А.Е.¹, ВОЛОСОВЕЦ А.П.², БОРИСОВА Т.П.¹

¹ГУ «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины»

²Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев

АКТИВИРОВАННЫЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ МЕТАБОЛИТЫ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ. ГЕНЕРАТОРЫ И ГЕНЕРАЦИЯ (часть 2-я)

Резюме. В обзоре литературы изложены современные данные об индукции и ингибции синтеза монооксида азота (NO) при заболеваниях органов дыхания. Детально рассмотрены индукция генерации NO цитокинами, регуляция генерации NO Th₁- и Th₂-лимфоцитами. Представлены сигнальные пути основных индукторов индуцибельной или макрофагальной нитрооксидсинтазы (iNOS), а также факторы транскрипции, участвующие в регуляции активности гена iNOS. Показаны особенности продукции NO в зависимости от локальных условий.

Ключевые слова: активированные азотсодержащие метаболиты, легкие.

Введение

Монооксид азота (NO), являясь молекулярным мессенджером и регулятором клеточных функций, участвует в различных физиологических и патологических процессах в респираторной системе. В дыхательных путях NO продуцируется нитрооксидсинтазами (NOS) самых разнообразных клеток — эпителиоцитов, эндотелиоцитов, провоспалительных клеток иммунной системы (макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки, Т-лимфоциты), нейронов. Несмотря на то что уровень продукции NO эпителиоцитами не превышает объемы генерации NO макрофагами, эпителий респираторного тракта считают уникальным континуумным паттерном, который участвует в обмене NO [9, 22].

Индукция синтеза монооксида азота

В респираторном тракте содержание NO обусловлено ферментативной работой всех трех изоформ NOS [29]: нейрональной (nNOS, NOS₁), индуцибельной, или макрофагальной (iNOS, mNOS, NOS₂), эндотелиальной (eNOS, NOS₃).

Конститутивная продукция NO обусловлена возбуждением ионотропных и метаболитных рецепторов. Активация iNOS не зависит от концентрации внутриклеточного Ca²⁺. Возбуждение iNOS связано с активацией TLR, цитокиновых рецепторов [23].

Возбуждение ионотропных рецепторов способствует повышению внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺. Последние, формируя комплекс Ca²⁺/кальмодулин, способствующий передаче электронов от НАДФ к редуцтазному домену, возбуждают предсуществующие конститутивные формы NOS (nNOS и eNOS) [15].

Возбуждение метаболитных рецепторов приводит к фосфорилированию сопряженных с ними G-белков. За счет замены ГДФ на ГТФ происходит диссоциация тримерного G-белка на две части — ГТФ-связанную α -субъединицу и гетеродимер $\beta\gamma$. ГТФ- α и гетеродимер $\beta\gamma$ индуцируют фосфоинозитол-3-киназу (PI3-K), аденилатциклазу, фосфолипазу-A₂, фосфолипазу-C_b и фосфодиэстеразу. Аденилатциклаза и PI3-K фосфорилируют сериновые аминокислотные остатки Ser⁶¹⁷, Ser¹¹⁷⁹ протеинкиназы-A и Ser⁶³⁵, Ser¹¹⁷⁹ протеинкиназы-Akt, которые затем активируют eNOS. Также стресс-индуцированный распад АТФ индуциру-

Адрес для переписки с авторами:
Абатуров Александр Евгеньевич
E-mail: alexabaturov@i.ua

© Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Борисова Т.П., 2015

© «Здоровье ребенка», 2015

© Заславский А.Ю., 2015

ет АМФ-киназу (АМПК), которая фосфорилирует Ser¹¹⁷⁹eNOS [2, 15].

Индукция гена *iNOS* обусловлена взаимодействием PAMP инфекционных агентов с TLR или цитокинов — эпидермального фактора роста (EGF), IL-1 β , IL-2, IL-17, IL-22, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- γ — со специфическими рецепторами клеток-продуцентов NO (рис. 1) [6, 13, 16, 19].

Возбуждение TLR-клеток ведет к активации рецептор-ассоциированной Janus-киназы-2 (JAK2), экстрацеллюлярной сигнал-регулируемой киназы 1/2 (Erk1/Erk2) и p38-митоген-активируемой протеинкиназы (p38-МАРК). Это определяет индукцию факторов транскрипции — NF- κ B, NF-ILC, STAT1, IRF-1 и GAF, которые и обуславливают активацию транскрипции гена *iNOS*. После индукции триггерными факторами активность *iNOS* появляется через 6–8 часов, в течение этого времени происходит индукция генов и синтез фермента (табл. 1) [12, 17].

Промотор гена *iNOS* содержит несколько сайтов связывания различных факторов транскрипции (NF- κ B, AP-1, STAT-1 α , IRF-1, NF-IL-6), что свидетельствует о сложности регуляции продукции индуцибельной нитрооксидсинтазы (табл. 2) [26, 27].

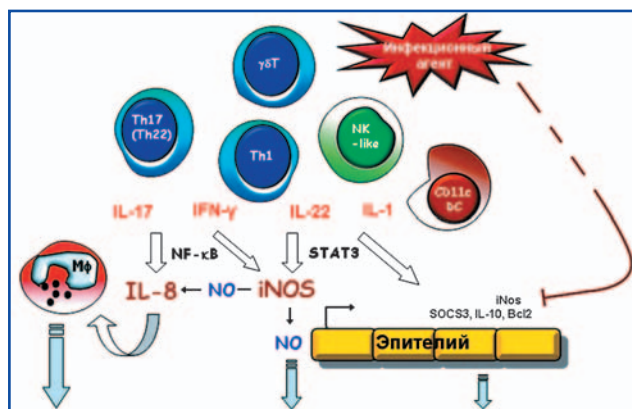


Рисунок 1. Индукция генерации NO цитокинами [16]

Учитывая, что активация гена *iNOS* происходит при одновременном возбуждении нескольких его специфических сайтов связывания, для индуцибельной продукции NO требуется комплексный стимул в виде сочетания PAMP с IFN- γ , или PAMP с IL-1 β , или PAMP с TNF- α [11]. EGF активирует PI3-K, протеинкиназу Akt, предопределяя усиление активности *iNOS*, а также экспрессии IL-1R₁ [6, 12].

Также активация α_{1A} -адренорецепторов индуцирует экспрессию *iNOS* [21] и малой ГТФазы Rac2 [20]. При заболеваниях органов дыхания в индукции синтеза NO особую роль играет активация регулирующих гипоксией элементов промотора гена *iNOS*.

Ингибция синтеза монооксида азота

Продукция NO регулируется на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях.

Предупреждение повышения концентрации NO выше цитотоксического уровня обусловлено ингибцией *iNOS* собственно самим монооксидом азота, по типу обратной отрицательной связи; производными L-аргинина (NG-монометил-L-аргинином (NMMA), асимметричным N^G,N^G-диметил-L-аргинином (ADMA), N-нитро-L-аргининметиловым эфиром (NAME)), действием ингибирующих протеинов, деградацией *iNOS* [20, 21]. Ингибирующее действие на *iNOS* оказывают гуанин-нуклеотид-фактор обмена калирин и NOS-ассоциируемый протеин-110 kDa (NAP110). Калирин связывается с первыми 70 аминокислотными остатками *iNOS*, а NAP110 взаимодействует с NH₂ терминальным доменом *iNOS*, предотвращая димеризацию NOS. Ингибирующее действие калирин проявляет в нейронах, а NAP110 — в макрофагах. Основными протеолитическими системами, ответственными за регулируемую деградацию *iNOS*, являются кальпаиновый и убиквитин-протеосомный пути протеолиза. В процессе деградации NOS

Таблица 1. Сигнальные пути основных индукторов *iNOS*

Индуктор	Сигнальные пути
<i>Вирусные и бактериальные продукты</i>	
LPS	TLR4 → ERK1/2 и p38 MAPK → <i>iNOS</i>
19-кДа липопротеин <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	TLR2 → ERK1/2 и p38 MAPK → <i>iNOS</i>
Флагеллин	TLR5 → ERK1/2 и p38 MAPK → <i>iNOS</i>
Бактериальная ДНК	TLR9 → MyD88 → p38 MAPK → <i>iNOS</i>
Вирусная дцРНК	TLR3 → IRF-1 → <i>iNOS</i>
<i>Цитокины</i>	
IL-1F2/IL-1 β	Рецептор IL-1 β → p38 MAPK → NF- κ B → <i>iNOS</i>
IL-12 (p40)	Рецептор IL-12 → NF- κ B → <i>iNOS</i>
IL-17	Рецептор IL-17 → NF- κ B → <i>iNOS</i> Рецептор IL-17 → ERK1/2 и p38 MAPK → <i>iNOS</i>
IL-22	Рецептор IL-22 → ERK1/2 и p38 MAPK → <i>iNOS</i> Рецептор IL-22 → STAT3 → <i>iNOS</i>
IFN- γ	Рецептор IFN- γ → JAK → STAT → <i>iNOS</i>

участвуют глюкокортикоиды, кавеолин-1, белок Hsp90, нейротоксические молекулы, ингибиторы NOS [10, 18, 21, 28].

Экспрессию iNOS ингибируют и некоторые цитокины: TGF-β, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, IFN-α/β [3]. Таким образом, Th₁-ассоциированные цитокины стимулируют, а Th₂-ассоциированные цитокины ингибируют экспрессию и активность iNOS (рис. 2).

Синтез монооксида азота

Фермент NOS производит NO из L-аргинина в результате реакции 2L-аргинин + 3НАДФН + 4O₂ + 3H⁺ → 2L-цитруллин + 2NO + 3НАДФ⁺ + 4H₂O.

Электроны, полученные в результате деятельности НАДФ, переносятся из редуцтазного в ок-

сигеназный домен молекулы нитрооксидсинтазы, где, взаимодействуя с ионом железа и ВН₄, катализируют реакцию взаимодействия кислорода и L-аргинина. В результате вначале образуется N^ω-ОН-L-аргинин как промежуточная форма окисления, а в последующем — L-цитруллин и монооксид азота (рис. 3) [2, 14].

Функционирование NOS зависит от локальных условий, особенности влияния которых представлены на рис. 4 на примере eNOS.

Нитрооксидсинтазы могут генерировать NO и в мономерном виде [5, 8].

Эпителиоциты респираторного тракта на протяжении всей слизистой оболочки и альвеолоциты обладают способностью экспрессировать мРНК iNOS и индуцибельно генерировать NO. Показано, что iNOS эпителиоцитов расположена рядом с субмембранным белковым комплексом, который тесно связан с кортикальным F-актином и физически взаимодействует с апикальным эзринрадин-синмоэзин-связанным фосфопротеином (EBP50). Взаимодействие iNOS с EBP50 и обуславливает высвобождение NO из внутриклеточного континуума

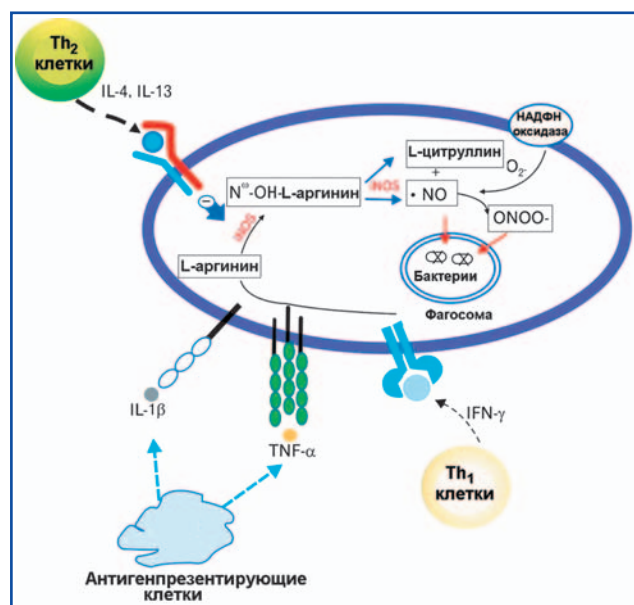


Рисунок 2. Регуляция генерации NO Th₁- и Th₂-лимфоцитами [30]

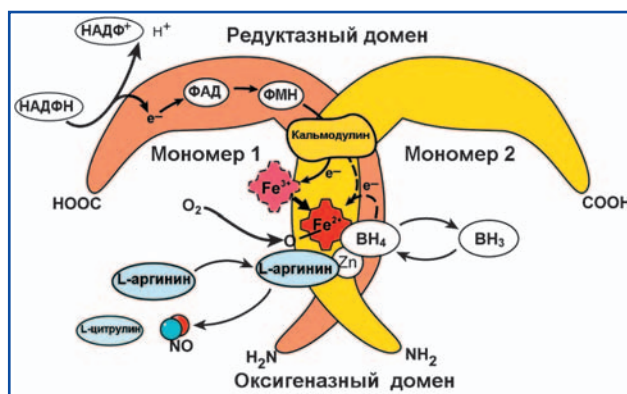


Рисунок 3. Синтез монооксида азота [4]

Таблица 2. Факторы транскрипции, участвующие в регуляции активности гена iNOS [24]

Фактор транскрипции	Триггеры	Регион связывания промотора	Эффект
NF-κB (p50; p65)	LPS, вирусные PAMP, цитокины, окислительный стресс	MP: (i)–76–85 (ii)–974–960 RP: (i)–107–98 (ii)–965–956 HP: (i)–115–106	Трансактивация
C/EBP	LPS, вирусные продукты, лигация CD40, цАМФ, гипоксия IL-1F2/IL-1β, дцРНК, метаболиты глюкозы	MP: (i)–153/–142 RP: (i)–155–163 HP: (i)–205 + 88	Ко-активация
STAT-1	IFN-γ	MP: (i)–934–942 RP: (i)–936–928	В зависимости от стимула
IRF-1	IFN-γ	MP: (i)–901–913 (ii)–913–923 RP: (ii)–929–881 HP: ?	Специфично
AP-1	Галактозилсфингозин, цитокины	MP: (i)–1125 HP: (i)–5115 (ii)–5301(78)	Может как индуцировать, так и ингибировать активность гена iNOS

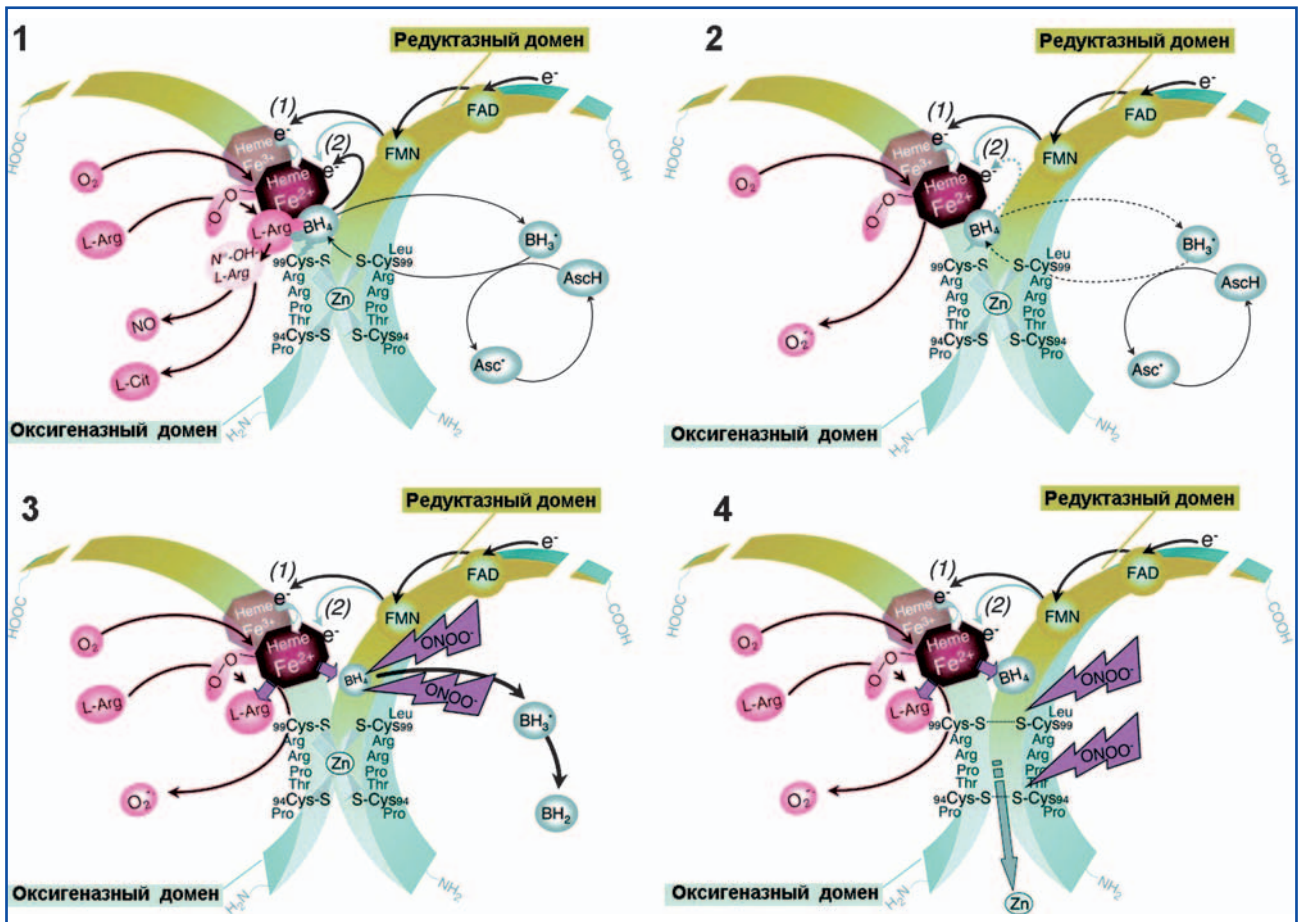


Рисунок 4. Особенности продукции NO в зависимости от локальных условий [8]

Примечания: 1) все изоформы NOS включают металлсодержащий кластер, образованный ионом цинка и двумя SXXXXC мотивами димерной формы молекулы NOS. Этот сайт связывает не только ионы цинка, но и кофактор BH₄ и L-аргинин. Перенос электрона из области редуцтазного домена (1) позволяет красно-коричневому оксиду железа (Fe²⁺) гема взаимодействовать с O₂ и переходить в черный оксид железа (Fe³⁺). Черный оксид железа может получить второй электрон преимущественно от BH₄ или от редуцтазного домена (2). Это активирует кислород и обуславливает гидроксирование L-аргинина. 2) В условиях дефицита L-аргинина происходит активная генерация супероксида аниона радикала. 3) Сочетанная выраженная продукция супероксида аниона радикала НАДФН оксидазой и NO-нитрооксидсинтазой приводит к образованию аниона пероксинитрита ONOO⁻, который окисляет BH₄, обуславливая подавление генерации NO. 4) Окисление ONOO⁻-тиоловых групп металлсвязывающего кластера приводит к потере иона цинка и дестабилизирует димер NOS, что обуславливает преобладание генерации супероксида аниона радикала за счет генерации NO.

через апикальную поверхность мембраны клетки [7, 21]. Молекулы NO, несмотря на свою высокую биохимическую активность, способны транспортироваться на расстояния, не превышающие размеры нескольких клеток [1].

Список литературы

1. Ванин А.Ф. NO в биологии: история, состояние и перспективы исследований // Биохимия. — 1998. — Т. 63, вып. 7. — С. 867-869.
 2. Alderton W.K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles // Biochem. J. — 2001. — Vol. 357. — P. 593-615. PMID: 11463332.
 3. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response // Nat. Immunol. — 2001. — Vol. 2, № 10. — P. 907-916. PMID: 11577346.
 4. Comhair S.A. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities / S.A. Comhair, S.C. Erzurum // Antioxid. Redox Signal. — 2010. — Vol. 12, № 1. — P. 93-124. doi: 10.1089/ARS.2008.2425.

5. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms// Nitric Oxide. — 2010. — Vol. 23, № 1. — P. 1-11. doi: 10.1016/j.niox.2010.03.001. Epub 2010 Mar 18.
 6. Epidermal growth factor and interleukin-1 synergistically stimulate the production of nitric oxide in rat intestinal epithelial cells / K. Kitagawa, Y. Hamada, Y. Kato et al. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2004. — Vol. 287. — P. G1188-G1193. PMID: 15271652
 7. Epithelial inducible nitric-oxide synthase is an apical EBP50-binding protein that directs vectorial nitric oxide output / Glynne P.A., Darling K.E., Picot J., Evans T.J. // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 33132-33138. PMID: 12080081
 8. Förstermann U. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace / U. Förstermann, T. Münzel // Circulation. — 2006. — Vol. 113, № 13. — P. 1708-1714. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532.
 9. Goodrum K.J. Cytokine Responses to Group B Streptococci Induce Nitric Oxide Production in Respiratory Epithelial Cells / K.J. Goodrum, J. Poulson-Dunlap // Infect Immun. — 2002 Jan. — 70 (1). — P. 49-54. doi: 10.1128/IAI.70.1.49-54.2002.

10. Krajewska W.M. Caveolins: structure and function in signal Transduction / W.M. Krajewska, I. Mastowska // *Cell. Mol. Biol. Lett.* — 2004. — Vol. 9. — P. 195-220. PMID: 15213803.
11. Kwon S. Synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells / S. Kwon, S.C. George // *Nitric Oxide.* — 1999. — Vol. 3. — P. 348-357. PMID:10444374.
12. Liu J. Exhaled breath condensate as a method of sampling airway nitric oxide and other markers of inflammation / J. Liu, P.S. Thomas // *Med. Sci. Monit.* — 2005. — Vol. 11, № 8. — P. MT53-MT62. PMID:16049390.
13. Lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced nitric oxide production and protein oxidation in mouse peritoneal macrophages are affected by glutathione peroxidase-1 gene knockout / Fu Y., McCormick C.C., Roneker C., Lei X.G. // *Free Radic. Biol. Med.* — 2001. — Vol. 31. — P. 450-459. PMID:11498278
14. MacMicking J. Nitric oxide and macrophage function / MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C. // *Annu. Rev. Immunol.* — 1997. — Vol. 15. — P. 323-350. PMID:9143691.
15. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells / Arzumanyan V., Stankevicius E., Laukevičienė A., Kėvelaitis E. // *Medicina.* — 2003. — Vol. 39, № 6. — P. 535-541. PMID: 12829875.
16. Muhl H. Inducible NO synthase and antibacterial host defence in times of Th17/Th22/T22 immunity / Muhl H., Bachmann M., Pfeilschifter J. // *Cell. Microbiol.* — 2011. — Vol. 13, № 3. — P. 340-348. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01559.x. Epub 2010 Dec 28.
17. Nitric Oxide in Health and Disease of the Respiratory System / Ricciardolo F.L.M., Sterk P.J., Gaston B., Folkerts G. // *Physiol. Rev.* — 2004. — Vol. 84, № 3. — P. 731-765. doi: 10.1152/physrev.00034.2003.
18. Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies / R. Saini, S. Patel, R. Saluja et al. // *J. Leukocyte Biol.* — 2006. — Vol. 79. — P. 519-528. PMID:16387842.
19. Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics / Sharpe M.A., Ollosson R., Stewart V.C., Clark J.B. // *Biochem. J.* — 2002. — Vol. 366. — P. 97-107. PMID:11994046.
20. Protein-protein interactions involving inducible nitric oxide synthase / W. Zhang, T. Kuncewicz, Z.Y. Yu et al. // *Acta Physiol. Scand.* — 2003. — Vol. 179. — P. 137-142. PMID:14510776.
21. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide / Kone B.C., Kuncewicz T., Zhang W., Yu Z.-Y. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* — 2003. — Vol. 285. — P. F178-F190. doi: 10.1152/ajprenal.00048.2003.
22. Rao K.M.K. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types // *J. Toxicol. Environ Health B Crit. Rev.* — 2000 Jan-Mar. — 3 (1). — P. 27-58. doi: 10.1080/109374000281131.
23. Ricciardolo F.L.M. Multiple roles of nitric oxide in the airways // *Thorax.* — 2003. — Vol. 58. — P. 175-182. doi: 10.1136/thorax.58.2.175.
24. Saha R.N. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells / R.N. Saha, K. Pahan // *Antioxid. Redox. Signal.* — 2006. — Vol. 8, № 5-6. — P. 929-947. PMID:16771683.
25. Specific association of nitric oxide synthase-2 with Rac isoforms in activated murine macrophages / Kuncewicz T., Balakrishnan P., Snuggs M.B., Kone B.C. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* — 2001. — Vol. 281. — P. F326-F336. PMID: 11457725.
26. Transcriptional and post-transcriptional regulation of iNOS expression in human chondrocytes / N. Schmidt, A. Pautz, J. Art et al. // *Biochem. Pharmacol.* — 2010. — Vol. 79, № 5. — P. 722-732. doi: 10.1016/j.bcp.2009.10.012. Epub 2009 Oct 23.
27. The role of nitric oxide in inflammatory reactions / Tripathi Pl., Tripathi P., Kashyap L., Singh V. // *FEMS Immunol Med Microbiol.* — 2007 Dec. — 51 (3). — P. 443-452. doi: http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x.
28. Ubiquitination of inducible nitric oxide synthase is required for its degradation / Kolodziejcki P.J., Musial A., Koo J.S., Eissa N.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99. — P. 12315-12320. PMID:12221289.
29. Van der Vliet A. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease? / Van der Vliet A., Eiserich J.P., Cross C.E. // *Respirat. Res.* — 2000. — Vol. 1. — P. 67-72. PMID:11667967.
30. Yang C.S. The role of nitric oxide in mycobacterial infections / Yang C.S., Yuk J.M., Jo E.K. // *Immune Netw.* — 2009. — Vol. 9, № 2. — P. 46-52.

Получено 15.11.15 ■

Абатуров О.Є.¹, Волосовець О.П.², Борисова Т.П.¹¹ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України»²Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

АКТИВОВАНІ АЗОТУМІСНІ МЕТАБОЛІТИ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ ОРГАНІВ ДИХАННЯ. ГЕНЕРАТОРИ І ГЕНЕРАЦІЯ (ЧАСТИНА 2)

Резюме. В огляді літератури викладені сучасні дані щодо індукції та інгібіції синтезу монооксиду азоту (NO) при захворюваннях органів дихання. Детально розглянуті індукція генерації NO цитокінами, регуляція генерації NO Th₁-та Th₂-лімфоцитами. Представлені сигнальні шляхи основних індукторів індукційної або макрофагальної нітрооксидсинтази (iNOS), а також фактори транскрипції, що беруть участь у регуляції активності гена iNOS. Показані особливості продукції NO залежно від локальних умов.

Ключові слова: активовані азотумісні метаболіти, легені.

Abaturov O.Ye.¹, Volosovets O.P.², Borysova T.P.²¹State Institution «Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Healthcare of Ukraine», Dnipropetrovsk²National Medical University named after O.O. Bohomolets, Kyiv, Ukraine

ACTIVATED NITROGEN-CONTAINING METABOLITES OF THE HUMAN BODY IN RESPIRATORY DISEASES. GENERATORS AND GENERATION (PART 2)

Summary. This literature review presents current data about the induction and inhibition of the synthesis of nitric oxide (NO) in respiratory diseases. We have discussed in detail the induction of NO generation by cytokines, the regulation of NO generation by Th₁- and Th₂-lymphocytes. The signal pathways of the main inducers of the inducible or macrophage nitric oxide synthase (iNOS), as well as transcription factors involved in the regulation of iNOS gene activity were shown. The features of NO production were presented depending on local conditions.

Key words: activated nitrogen-containing metabolites, lungs.