

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ПАТОЛОГИИ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА (часть II)

А.И. Дубиков, А.В. Череповский, Л.А. Белоголовых, Е.А. Медведь, С.В. Никулин
Владивостокский государственный медицинский университет

Роли оксида азота (NO) при воспалительных заболеваниях суставов посвящено большое количество публикаций. Экспрессия нитрооксидсинтазы-2 (NOS-2) и повышенный синтез NO впервые были продемонстрированы в моделях органоспецифических аутоиммунных заболеваний *in vivo*, таких как экспериментальный аллергический энцефаломиелит и иммунологически опосредованный диабет у мышей без признаков ожирения [10, 11]. Далее, в нескольких моделях артритов на животных, включая линию мышей MRL/lpr, адьювантный артрит, коллаген-индуцированный артрит, также была обнаружена экспрессия NOS-2 и повышение продукции NO [5, 40, 45]. Экспериментальный артрит был предотвращен применением ингибитора NOS-2, NG-монометилового L-аргинина (L-NMMA), что подтвердило возможную ключевую роль NO в развитии и персистировании воспаления в этих моделях.

Экскреция нитратов с мочой у больных ревматоидным артритом (РА) была в 2,7 раза выше в сравнении с группой здоровых людей и уменьшалась при назначении преднизолона [42]. Однако, величина экскреции нитратов не коррелировала с уровнем С-реактивного белка (СРБ), скоростью оседания эритроцитов (СОЭ), суставным счетом, продолжительностью утренней скованности. Коэффициент соотношения нитраты/креатинин в моче также оказался существенно повышенным (более чем в три раза) при РА [15].

Определения концентрации нитритов в сыворотке крови у больных РА, анкилозирующим спондилоартритом и остеоартрозом (ОА), а также выявили повышение последних в сравнении с контролем, соответствующим по возрасту и полу [13, 33]. Следует отметить, что концентрация нитритов у больных РА была выше, чем у больных ОА, что отражает доминирующую патофизиологическую сущность РА - воспаление. Однако достоверной корреляции между уровнем нитритов и СРБ, СОЭ, индексами активности болезни не было выявлено [7]. В то же время другие исследователи подобные корреляции обнаружили. Так, уровень нитратов в крови у больных РА, определяемый колориметрическим методом, коррелировал с количеством болезненных и припухших суставов, индексом Ричи, DAS индексом [32]. Последние исследования с использованием хемилюминисцентного метода показали, что концентрация метаболитов NO в плазме больных РА была значительно выше, чем у здоровых субъектов и больных ОА [12, 43]. Интенсивность продукции NO коррелировала с показателями активности РА, такими как продолжительность утренней скованности, количество воспаленных и болезненных суставов, уровень СРБ [31].

Концентрация метаболитов NO в сыворотке крови значимо коррелирует с уровнем фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкином-6 (IL-6) у этих же больных. У больных ювенильным РА в период обострения в плазме крови уровень метаболитов NO, включая цитруллин, был повышен в сравнении с больными в фазе частичной или полной ремиссии [2]. В этой группе больных выявлены значимые корреляции между метаболитами NO и индексами воспаления, СОЭ, модифицированным "детским" HAQ.

Возможно, такая разноречивость результатов связана с

временной компонентой, поскольку период полужизни нитритов очень короткий.

Сообщается о наличии NOS-зависимой эндотелиальной дисфункции у больных РА [46]. Базальный кровоток у этих больных значительно повышен и коррелирует с концентрацией СРБ и величиной СОЭ, снижаясь при назначении блокаторов NO.

Уровень 3-нитротирозина (3-NT), который появляется при зависимом от NO оксидативном стрессе и является маркером пероксинитрита (ONOO-), также повышен у больных РА [19], а в сыворотке крови, полученной от больных ОА и здоровых, 3-NT вообще не выявлен. Оценивать эти данные необходимо с учетом того факта, что 3-NT содержится в клеточных элементах синовиальной оболочки и гладкомышечных клетках сосудов здоровых людей, но отсутствует в других тканях [24]. Подчеркивается, что наличие 3-NT не ассоциировано с экспрессией NOS-2, что позволяет говорить о физиологической роли ONOO- в здоровой синовиальной ткани, в частности в её сосудистом компоненте. Исследование концентрации 3-NT в синовиальной оболочке больных РА и ОА показало его наличие во всех образцах, особенно в стромальном слое [37]. Изучение полиморфизма гена-промотера NOS-2 у больных РА не выявило влияния последнего на особенности клинической картины и течения заболевания [34].

Все вышеперечисленные факты позволяют утверждать, что интенсивность продукции NO у больных РА отражает напряженность воспалительного процесса.

Последние исследования интенсивности экспрессии NOS-2 мононуклеарами периферической крови у больных РА показали ее высокий уровень экспрессии в сравнении с группой здоровых лиц, что указывает на системный характер активации NOS-2 при РА [39]. Стимуляция мононуклеарных клеток интерфероном-гамма (INF-γ) способствовала повышенной экспрессии NOS-2 и продукции нитритов/нитратов *in vitro*. Активность NOS-2 в мононуклеарных клетках коррелировала с активностью патологического процесса (количеством воспаленных и болезненных суставов).

Концентрация нитритов в синовиальной жидкости у больных РА была значительно выше концентрации нитритов в сыворотке крови у этих же больных, что иллюстрирует высокий локальный синтез NO в суставах, пораженных РА [13]. Источником NO в синовиальной жидкости являются гранулоциты, поскольку выявлен высокий уровень экспрессии ими NOS-2 в сравнении с гранулоцитами крови у тех же больных [6]. Группа исследователей [18] обнаружила повышение концентрации метаболитов NO не только при РА, но и при подагре и ОА, что подразумевает не обязательно специфический, иммунологически опосредованный характер воспаления, а скорее свидетельствует о его неспецифичности [36].

Культивируемые *ex vivo* синовиальная ткань и хондроциты продуцируют существенно повышенное количество нитритов, а добавление L-NMMA к культуре клеток ингибирует синтез последних [36]. Иммуногистохимические исследования показали, что в синовиоцитах, эндотелиальных клетках и хондроцитах NOS-2 экспрессируется в большей степени, чем в инфильтрирующей синовиальную оболочку мононуклеарных клетках и фибробластах. Большинство синовиоцитов и инфильтрирующих мононуклеаров, иммуно-

реактивных к NOS-2, экспрессировали CD14 и HLA-DR рецепторы [38, 47]. Этот факт позволяет предположить, что основными продуцентами NOS-2 являются А-синовиоциты. По данным некоторых авторов и в эндотелиальных, и в выстилающих клетках нормальной синовиальной оболочки NOS-2 экспрессируется в минимальных количествах [16]. Western blot анализ ревматоидной синовиальной оболочки показал присутствие протеина с массой 130 kDa, аутентичного человеческой NOS-2. Полимеразная цепная реакция подтвердила экспрессию значительного количества информационной РНК (иРНК) NOS-2 в синовиальной оболочке при РА и ОА [26, 29]. Интенсивная экспрессия NOS-2 найдена не только в синовиальной оболочке, но и в паннусе пораженных суставов у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий TNF- α (Tg197 h-TNF- α) [17]. Продукция NO в свежей культуре синовиальных клеток повышалась после обработки смесью IL-1 β , TNF и липополисахаридом [18]. В то же время культура длительно живущих синовиальных фибробластов не повышала продукцию NO после стимуляции. Однако ряд авторов утверждает, что большинство продуцирующих NO клеток синовиальной оболочки являются В-клетками (фибробластами) [29].

Является ли повышенная продукция NO провоспалительным фактором или противовоспалительным - остается неясным. Возможные провоспалительные эффекты NO включают повышение сосудистой проницаемости в воспаленных тканях [25], генерацию деструктивных свободных радикалов, таких как пероксинитрит [1], индукцию циклооксигеназы (COX) и провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 [21, 29]. NO может быть причастен к синтезу антигенных цитокинов [23] и активации матричных металлопротеиназ (ММП). Экспериментальные модели артритов регрессировали при введении ингибиторов синтеза NO [9, 27, 41]. Эти факты являются яркой иллюстрацией провоспалительной роли NO. Вместе с тем NO и его дериват S-нитрозоглютамин ингибируют синтез ДНК в Т-клетках с повышением внутриклеточной концентрации циклического ГМФ, что может объяснить супрессию функции Т-клеток у больных РА [30]. В этом смысле NO может выступать как противовоспалительный агент. Приводятся данные о том, что NOS-2 обратно блокирует пролиферацию Т-лимфоцитов, однако в синергическом взаимодействии с другим ферментом L-аргининового метаболического цикла - аргиназой-1 обуславливает апоптоз активированных Т-лимфоцитов [3]. Вполне возможно, что NO способен оказывать противоположные биологические эффекты в зависимости от локальной концентрации. Высказывается мысль, что NO скорее модулирует воспалительный процесс, чем является прямым медиатором последнего [8]. Удалось показать, что NOS-2 вовлечена в иммунный ответ только на ранних стадиях развития адьювантного артрита, а NO не играет особой роли в персистенции воспаления на поздних стадиях этой модели [14].

В дальнейших исследованиях было показано, что экспрессия NOS-2 на ранних стадиях адьювантного артрита является защитной реакцией и предотвращает инфильтрацию лейкоцитами тканей сустава с его последующей деструкцией [44]. Попытка лечения индуцированного стрептококковым антигеном артрита у крыс селективным ингибитором NOS-2 (N-иминоэтил-L-лизин) в острой фазе не имела успеха, а в хронической фазе приводила к резкому

обострению процесса с выраженной деструкцией тканей сустава [28]. При этом иммуногистохимическим методом верифицировано достоверное снижение экспрессии NOS-2, но появление экспрессии NOS-1 и NOS-3 в синовиальной оболочке воспаленных суставов. Назначение неселективного ингибитора конститутивной и индуцибельной изоформ NOS (N-мометил-L-аргинин) сопровождалось регрессией артрита. Эти данные определяют правомочность постановки вопроса о роли конститутивных форм NOS в развитии артрита. В то же время получен профилактический эффект в отношении артрита, вызванного зимозаном, при назначении селективных и неселективных ингибиторов NO [35].

Обсуждая возможный вклад NOS-2 в развитие экспериментального артрита, нельзя не привести результаты, полученные при моделировании лаймского артрита в двух линиях мышей: DBA/2J резистентной к развитию артрита и C3H/HeJ восприимчивой к развитию артрита [4]. Обе линии затем трансформировали в генетически дефицитные по экспрессии NOS-2. Несмотря на то, что обе линии были дефицитны по ключевому антимикробному агенту, гистологические признаки артрита и контракция V.Burgdoferi в тканях оказались одинаковыми в обеих линиях животных. Другая группа авторов приводит результаты исследования экспрессии NOS-2 в синовиальной оболочке коз, инфицированных вирусом козьего артрита-энцефалита (CAEV) [22]. Авторы утверждают, что ими не обнаружено доказательств прямой стимуляции вирусом экспрессии NOS-2, а также участия NOS-2 в антивирусном ответе. Наличие NOS-2 в синовии было выявлено только на поздних стадиях артрита. Большинство NOS-2 позитивных клеток не несли рецепторов MHC II класса и CD68, что позволило идентифицировать их, как синовиоциты типа В. Предполагается, что NOS-2 в большей степени вовлекается в ремоделирование тканей и формирование рубцовой ткани. На линиях мышей, дефицитных по гену экспрессии NOS-2 (C57BL/6Ai-[ko] NOS2 N5 (NOS2-/-)), в сравнении с линией мышей C57/Bl6 C_{rl} (wild-type, WT) в условиях аутоиммунного артрита было показано, что делеция гена NOS-2 снижает количество нитротирозин-позитивных хондроцитов и уровень нитратов/нитритов в крови в первой линии. Однако при этом не обнаружено разницы в экспрессии ММП-3 и ММП-9 в хондроцитах и уровне IL-1 β в крови животных обеих линий [19]. Авторы делают вывод, что удаление гена NOS-2 не влияет на развитие артрита, но уменьшает степень дегенерации хряща.

Таким образом, несмотря на огромное количество публикаций, посвященных репертуару NO в метаболизме хряща и воспалении синовиальной оболочки, характерной чертой современных знаний по этому предмету следует считать чрезвычайную противоречивость данных. Безусловно, биологический смысл молекулы NO в патологии опорно-двигательного аппарата далеко не раскрыт до конца. Во многом это связано с недостатком клинических работ, исследующих синхронный синтез NO в различных средах в условиях целостного организма больных с воспалительными и дегенеративными заболеваниями суставов. Особый интерес представляют данные о взаимодействии NO с другими универсальными регуляторными механизмами: цитокиновым контуром и апоптозом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen T.W. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 1620-1624
2. Beri A., Singh S., Gupta A. et al. Comparison of serum nitric oxide levels in active juvenile rheumatoid arthritis with those of patients in remission. Rheum.Intl., Online, Available: <http://www.springerlink.com/app/home/contribution.asp?wasp=pgmlumxmqmte7r03eua0&referrer=parent&backto=issue,19,96;journal,1,40;linkingpublicationresults,id:101577,1>. 2003. Oct 31
3. Bronte V., Serafini P., Mazzoni A. et al. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. Trends in Immunol., 2003, 24, 6, 302-306
4. Brown C.R., Reiner S.L. Development of lyme arthritis in mice deficient in inducible nitric oxide synthase. Infect.

- Dis., 1999, 179, 6, 1573-1576
5. Cannon G.W., Oppenshaw S.J., Hibbs J.B. et al. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1996, 39, 1677-1684
 6. Cedergren J., Forslund T., Sundovist T. et al. Inducible nitric oxide synthase is expressed in synovial fluid granulocytes. *Clin. Experim. Immunol.*, 2002, 130, 1, 150
 7. Choi J.W. Nitric oxide production is increased in patients with rheumatoid arthritis but does not correlate with laboratory parameters of disease activity. *Clin. Chim. Acta*, 2003, 336, 1-2, 83-87
 8. Conforti A., Lussignoli S., Bertani S. et al. Cytokine and nitric oxide levels in a rat model of immunologic protection from adjuvant-induced arthritis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2001, 14, 3, 153-160
 9. Connor J.R., Manning P.T., Settle S.L. et al. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995, 273, 15-24
 10. Corbett J.A., Mikhael A., Shimizu J. et al. Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice: aminoguanidine sensitive and -resistant stages in the immunological diabetes process et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 8992-8995
 11. Cross A.H., Misko T.P., Lin R.F. et al. Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *J. Clin. Invest.*, 1993, 93, 2684-2690
 12. Ersoy Y., Ozerol E., Baysal O. et al. Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002, 61, 1, 76 - 78
 13. Farrel A.J., Blake D.R., Palmer R.M. et al. Increased concentration of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, 1992, 51, 1219-1222
 14. Fletcher D.S., Widmer W.R., Luell S. et al. Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-induced arthritis in rats. *J. of Pharmacol. Experim. Therap.*, 1998, 284, 2, 714-721
 15. Grabowski P.S., England A.J., Dykhuizen R. et al. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. Detection using the fasting urinary nitrate: creatinine ratio. *Arthr. Rheum.*, 1996, 39, 643-647
 16. Hirata Y., Emori T., Eguchi S. et al. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 1996, 91, 1367-1373
 17. Hukkanen M.J.J., Platts L.A., Haralambous S. et al. Induction of inducible nitric oxide synthase, argininosuccinate synthase, and GTP cyclohydrolase I in arthritic joints of human tumor necrosis factor- α transgenic mice. *J. Rheum.*, 2003, 30, 4, 652-659
 18. Hukkanen M.J.J., Polak J.M., Hughes S.P.F. Nitric oxide in bone and joint disease. Cambridge, 1998
 19. Kato H., Nishida K., Yoshida A. et al. Effect of NOS2 gene deficiency on the development of autoantibody mediated arthritis and subsequent articular cartilage degeneration. *J. Rheum.*, 2003, 30, 2, 247-255
 20. Kaur H., Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.*, 1994, 350, 9-12
 21. Lander H.M., Sehajpal P., Levine D.M. et al. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J. Immunol.*, 1993, 150, 1509-1516
 22. Lechner F., Schutte A., Von Bodungen U. et al. Inducible nitric oxide synthase is expressed in joints of goats in the late stage of infection with caprine arthritis encephalitis virus. *Clinical Experimental Immunol.*, 1999, 117, 1, 70-75
 23. Leibovich S.J., Polverini P.J., Jong T.W. Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginin/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4190-4194
 24. Mapp P.I., Klocke R., Walsh D.A. et al. Localization of 3-nitrotyrosine to rheumatoid and normal synovium. *Arthritis Rheum.*, 2001, 44, 7, 1534-1539
 25. Mayhan W.G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5-diphosphate and bradykinin. *Inflamm.*, 1992, 16, 295-305
 26. Mazzetti I., Grigolo B., Pulsatelli L. et al. Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin. Sci.*, 2001, 101, 6, 593-599
 27. McCartney-Francis N., Allen J.B., Mizel D.E. et al. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 749-754
 28. McCartney-Francis N.L., Song X.-y., Mizel D.E. et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *J. Immunol.*, 2001, 166, 4, 2734-2740
 29. McInnes I.B., Leung B.P., Field M. et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J. Exp. Med.*, 1996, 184, 1519-1524
 30. Merryman P.F., Clancy R.M., He X.Y. et al. Modulation of human T cell responses by nitric oxide and its derivative, S-nitrosoglutathione. *Arthr. Rheum.*, 1993, 10, 1414-1421
 31. Moshaghi Kashanian G.R. Nitrite level of serum as a diagnostic and prognostic tool in patients with rheumatoid arthritis. *Archi. of Iran. Med.*, 1999, 2, 4, 23-26
 32. Onur O., Akinci A.S., Akbiyik F. et al. Elevated levels of nitrate in rheumatoid arthritis. *Rheum. Int.*, 2001, 20, 4, 154-158
 33. Ozgocmen S., Sogut S., Ardicoglu O. et al. Serum nitric oxide, catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheum. Int. Online*, Available: <http://www.springerlink.com/app/home/journal.asp?wasp=e2eyggvwwhdkx226ua5y&referrer=parent&backto=linking-publicationresults,id:101577,1,2003,Jun17>
 34. Pascual M., Lopez-Nevot M.A., Caliz R. et al. Genetic determinants of rheumatoid arthritis: the inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene promoter polymorphism. *Genes, Immunity*, 2002, 3, 299?-301
 35. Rocha J.C. da S., Peixoto M.E.B., Jancar S. et al. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 2002, 136, 4, 588-596
 36. Sakurai H., Kohsaka H., Liu M.F. et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J. Clin. Invest.*, 1995, 96, 2357-2363
 37. Sandhu J.K., Robertson S., Birnboim H.C. et al. Distribution of protein nitrotyrosine in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J. Rheum.*, 2003, 30, 6, 1173-1181
 38. Sekine C., Yagita H., Miyasaka N. et al. Expression and function of CD40 in rheumatoid arthritis synovium. *J. Rheum.*, 1998, 25, 1048-1053
 39. StClair E.W., Wilkinson W.E., Lang T. et al. Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. *J. Exp. Med.*, 1996, 184, 1173-1178
 40. Stefanovic-Racic M., Meyers K., Meschter C. et al. N-Monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. *Arthr. Rheum.*, 1994, 184, 1173-1178
 41. Stefanovic-Racic M., Stadler J., Georgesku H.I. et al. Nitric oxide and energy production in articular chondrocytes. *J. Cell Physiol.*, 1994, 159, 274-280
 42. Stichtenoth D.O., Fauler J., Zeidler H. et al. Urinary nitrate excretion is increased in patients with rheumatoid arthritis and reduced by prednisolone. *Ann. Rheum. Dis.*, 1995, 54, 820-824

43. Ueki Y., Miyake S., Tominaga K. et al. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 1996, 23, 230-236
44. Veihelmann A., Hofbauer A., Krombach F. et al. Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. *Rheum.*, 2002, 41, 509-517
45. Weinburg J.B., Granger D.L., Pisetsky D.S. et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered N-monomethyl-L-arginine. *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 651-660
46. Yki-Jarvinen H., Bergholm R., Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2003, 62, 630-634
47. Yonekura Y., Koshiishi I., Yamada K. et al. Association between the expression of inducible nitric oxide synthase by chondrocytes and its nitric oxide-generating activity in adjuvant arthritis in rats. *Nitric Oxide*, 2003, 8, 3, 164-169

Поступила 28.01.04