

Received: 2005.10.25  
Accepted: 2005.11.28  
Published: 2005.12.13

## Tlenek azotu wytwarzany przez leukocyty płucne w astmie oskrzelowej

### Nitric oxide produced by pulmonary leukocytes in bronchial asthma

**Małgorzata Bieńkowska-Haba**

Laboratorium Wirusologii, Zakład Immunologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Tlenek azotu jest cząsteczką o wielokierunkowym działaniu, uczestniczącą zarówno w fizjologicznych jak i patologicznych procesach. W zależności od stężenia, tlenek azotu może być zaangażowany w neurotransmisję, regulację ciśnienia i przepuszczalności naczyń, a także w odpowiedź odpornościową organizmu. Jest on wytwarzany przez wiele komórek w procesie utleniania L-argininy, katalizowanym przez syntazę tlenku azotu (NOS). Podwyższony poziom tlenku azotu zaobserwowano w powietrzu wydychanym przez chorych na astmę. Obecnie pomiar stężenia tego mediatora został uznany jako użyteczny w monitorowaniu intensywności zapalenia u chorych na astmę. Rola NO w patofizjologii astmy nie została jednakże ostatecznie określona. Nieustalone pozostaje także pochodzenie nadmiernej ilości tlenku azotu wydzielanego przez chorych na astmę. Syntazy tlenku azotu zostały zlokalizowane w różnych komórkach układu oddechowego włączając komórki nabłonka, mięśni gładkich oraz leukocyty płucne: makrofagi, eozynofile i neutrofile. Badania prowadzone dotąd koncentrują się głównie na komórkach nabłonka dróg oddechowych. Nieliczne dane dotyczą natomiast udziału leukocytów płucnych w wytwarzaniu tej cząsteczki. Praca omawia rolę tlenku azotu w procesach astmy oskrzelowej.

**Słowa kluczowe:**

**astma oskrzelowa • tlenek azotu • leukocyty płucne**

#### Summary

Nitric oxide (NO) is a multifunctional particle and may play diverse roles in physiological and pathological processes. Depending on its concentration, NO can be involved in neurotransmission, the regulation of smooth muscle and vascular tone, vascular permeability, as well as in immune response. NO is produced by a wide variety of cell types and is generated via oxidation of L-arginine, catalyzed by the enzyme NO synthase (NOS). Elevated concentrations of NO were observed in the exhaled air of asthmatics. Recently, the level of this mediator in exhaled air was considered a useful marker in monitoring inflammation as well as disease severity and exacerbation in asthma patients. However, the role NO in asthma is still unclear. The cellular source of the high concentration of nitric oxide in asthma is also not yet certain. Nitric oxide synthases (NOS) were localized in a variety of cells of the respiratory tract, including epithelial cells, smooth muscle cells, and also pulmonary leukocytes such as macrophages, eosinophils, and neutrophils. Most investigators concentrate on epithelial cells as a major source of nitric oxide in airways. There is a limited number of studies on the production of NO by pulmonary leukocytes. The review presents current knowledge on the role of nitric oxide in the process of asthma.

**Key words:**

**bronchial asthma • nitric oxide • pulmonary leukocytes**



**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/8524.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/8524.pdf)

**Word count:** 6216

**Tables:** 2

**Figures:** 8

**References:** 180

**Adres autorki:** dr Małgorzata Biełkowska-Haba, Laboratorium Wirusologii, Zakład Immunologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: bienko@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **AP-1** – czynnik transkrypcyjny AP-1 (activator protein); **Ang1** – angioproteina; **APC** – komórki prezentujące antygen (antigen-presenting cells); **BAL** – popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (bronchoalveolar lavage); **BALF** – płyn z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (bronchoalveolar lavage fluid); **b-FGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor); **BH4** – tetrahydrobiopteryna; **CAM** – komórkowa cząsteczka adhezyjna (cell adhesion molecule); **CD** – kompleks antygenów różnicowania (cluster of differentiation); **cGMP** – cykliczny guanozynomonofosforan; **ciAP 1, 2** – białko hamujące apoptozę (inhibitor of apoptosis protein); **COX** – cyklooksigenaza; **CysLT1** – leukotrieny cysteinylowe typu 1; **DC** – komórki dendrytyczne; **EAR** – wczesna reakcja astmatyczna (early asthmatic reaction); **ECP** – kationowe białko eozynofilowe (eosinophilic cationic protein); **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor); **EV** – wirus ektromelii; **FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy (postać utleniona); **Fas** – powierzchniowa cząsteczka należąca do rodziny receptorów TNF-pochodnych (CD95); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **FMN** – mononukleotyd flawinowy; **EMTU** – nabłonkowo-mezenchymalna jednostka troficzna (epithelial-mesenchymal trophic unit); **G-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (granulocyte colony stimulating factor); **GINA** – Światowa Inicjatywa Zwalczenia Astmy (Global Initiative for Asthma); **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony stimulating factor); **GRE** – region odpowiedzi na glukokortykosteroidy (glucocorticoid responsive element); **HRV** – ludzki rinowirus (*human rhinovirus*); **HSV-1** – wirus opryszczki pospolitej typu 1 (herpes simplex virus 1); **ICAM-1** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej typu 1 (intercellular adhesion molecule); **IFN** – interferon; **IFN- $\alpha$**  – interferon typu  $\alpha$ ; **IFN- $\alpha/\beta$**  – interferon typu I (mieszanina IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ ); **IFN- $\gamma$**  – interferon typu  $\gamma$ ; **Ig** – immunoglobulina (przeciwciało); **IL** – interleukina; **I.P.** – indukowana płwocina; **Jak 1, 2, 3** – kinazy tyrozynowe z rodziny Jak (Janus kinase); **LAR** – późna reakcja astmatyczna (late asthmatic reaction); **LTB<sub>4</sub>** – leukotrien B<sub>4</sub>; **LTC<sub>4</sub>** – leukotrien C<sub>4</sub>; **LTD<sub>4</sub>** – leukotrien D<sub>4</sub>; **LTE<sub>4</sub>** – leukotrien E<sub>4</sub>; **MCP-1** – główne białko kationowe (major cationic protein); **MMPs** – metaloproteinazy; **MMP-9** – metaloproteinaza 9 macierzy zewnątrzkomórkowej; **NADPH** – fosforan dinukleotydu nikotynoadeninowego (postać zredukowana); **NF $\kappa$ B** – czynnik jądrowy  $\kappa$ B, transkrypcyjny trans aktywator (nuclear factor  $\kappa$ B); **NHLBI** – Narodowy Instytut Serca, Płuc i Krwi (National Heart, Lung, and Blood Institute); **NK** – komórki NK (natural killers); **NO** – tlenek azotu (nitric oxide); **NOS** – syntaza tlenku azotu (nitric oxide synthase); **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu; **iNOS** – indukowalna syntaza tlenku azotu; **nNOS** – neuronalna syntaza tlenku azotu; **PAF** – czynnik aktywujący płytki krwi (platelet activating factor); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **PGE<sub>2</sub>** – prostaglanyna E<sub>2</sub>; **R** – receptor; **RNI** – reaktywne związki azotowe (reactive nitrogen intermediate); **RSV** – syncytialny wirus oddechowy (respiratory syncytial virus), wirus RS; **sCG** – rozpuszczalna cyklaza guanylowa; **SeIE** – selektyna E; **SeIP** – selektyna P; **STAT 4, 6** – białka będące aktywatorami transkrypcji różnych genów (signal transducers and activators of transcription); **Th1, Th2, Th3** – limfocyty pomocnicze typu 1, 2, 3 (lymphocytes T-helper type 1, 2, 3); **TGF** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor); **TGF- $\alpha$**  – transformujący czynnik wzrostu typu  $\alpha$ ; **TGF- $\beta$**  – transformujący czynnik wzrostu typu  $\beta$ ; **TLR** – homologi receptora Toll, zidentyfikowane u ssaków (toll-like receptors); **TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworów typu  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ); **TRAF 1, 2** – czynnik związany z receptorem TNF (TNF receptor associated factor); **TYK2** – kinaza tyrozynowa 2; **VCAM-1** – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń typu 1 (vascular cell adhesion molecule); **VLA-4** – ligand VCAM1; **VV** – wirus krowianki (vaccinia virus); **WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization).

## WPROWADZENIE

W patofizjologii astmy oskrzelowej podstawowym zjawiskiem jest przewlekły proces zapalny toczący się w drogach oddechowych, będący następstwem późnej reakcji alergicznej. Jego przebieg może być zaburzony przez „zapalenie niealergiczne” wywołane infekcjami bakteryjny-

mi, wirusowymi lub grzybiczymi, które zazwyczaj prowadzą do zaostrzenia objawów choroby.

Za jeden z ważnych mediatorów stanu zapalnego w astmie oskrzelowej uważany jest tlenek azotu (NO) [76]. Jego rola w patofizjologii astmy, szczególnie w zaostrzeniach choroby wywołanych zakażeniami dróg oddechowych, nie zo-

stała jednoznacznie ustalona. Badania prowadzone w różnych ośrodkach naukowych, koncentrują się głównie na komórkach nabłonka dróg oddechowych, a nie leukocytach obecnych w drogach oddechowych jako komórkach efektorowych i docelowych dla NO.

## LEUKOCYTY PŁUCNE

W obrębie układu oddechowego funkcjonuje odrębny, charakterystyczny system odpowiedzi zapalnej i odpornościowej. Błony śluzowe są miejscowo chronione przez różne substancje znajdujące się w wydzielinie pokrywającej nabłonek urzęsiony. W lokalnej odpowiedzi immunologicznej układu oddechowego duże znaczenie mają zarówno komórki nabłonka, jak i leukocyty występujące w drogach oddechowych.

Zapalenie w astmie oskrzelowej dotyczy głównie błony śluzowej i warstwy podśluzówkowej, a wyraża się m.in. wzmożoną aktywnością makrofagów i limfocytów rezydujących lokalnie oraz naciekiem z krwi do dróg oddechowych komórek odczynu zapalnego, takich jak: eozynofile, neutrofile, monocyty i limfocyty. Wymienione komórki można określić jako populację leukocytów płucnych. Wykazano, że w przeciwieństwie do leukocytów krwi obwodowej przejawiają one nadmierną reaktywność wytwarzając znaczne ilości cytokin [25,26,51].

Makrofagi oskrzelowo-pęcherzykowe stanowią większość leukocytów izolowanych z dróg oddechowych [50]. Komórki te migrują ze szpiku kostnego jako monocyty. Przez naczynia krwionośne docierają do płuc i przedostają się do przegrody międzypęcherzykowej. Stamtąd, już jako dojrzałe makrofagi płucne, przechodzą przez nabłonek do wnętrza pęcherzyka płucnego. Za pośrednictwem porów Kohna komórki te mogą swobodnie przemieszczać się z pęcherzyka do pęcherzyka. Rola makrofagów w odpowiedzi zapalnej jest dobrze poznana. Jako fagocyty i jako komórki prezentujące antygen czynnie uczestniczą w mechanizmach obronnych organizmu. Komórki te mogą wytwarzać różne cytokiny, takie jak: interleukina 1 (IL-1), -6, -8, -10, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony stimulating factor – GM-CSF), czynnik martwicy nowotworów typu  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$  – TNF- $\alpha$ ) i interferon typu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Zawierają również geny indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) [75]. Przez stymulację lub supresję komórek T makrofagi płucne odgrywają ważną rolę regulatorową w reakcjach zapalnych [162]. Makrofagi płucne mogą być także zaangażowane w procesy uszkodzenia i naprawy tkanek [72,120]. Wytwarzają one i wydzielają aktywator plazminogenu oraz enzymy z grupy metaloproteinaz, które mogą rozkładać różne składniki substancji międzykomórkowej [150]. W procesie przebudowy oskrzeli mogą brać udział przez wydzielanie czynników wzrostu. W przypadku makrofagów tymi czynnikami są: płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor – PDGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor-b-FGF) i transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor – TGF- $\beta$ ) [170].

Limfocyty to komórki ingerujące w niemal każdą odpowiedź immunologiczną i zapalną zachodzącą w obrębie płuc. Na podstawie różnic funkcjonalnych wyodrębnione

zostały dwa główne typy limfocytów: B oraz T. Pod wpływem kontaktu z limfocytym T (pobudzonym obecnością antygeny) i wydzielanych przez niego cytokin, limfocyty B wydzielają swoiste przeciwciała. Limfocyty T o fenotypie CD8+ pełnią funkcję komórek cytotoksycznych, natomiast CD4+ – pomocniczych (T – helper). W oparciu o profil cytokin wydzielanych przez klony mysich komórek T Mossman i Coffman wyodrębnili dwa podtypy tych limfocytów [117]. Limfocyty Th1 wydzielają IL-2, IFN- $\gamma$  i GM-CSF, które są związane z aktywacją mechanizmów obronnych skierowanym przeciwko wirusom i bakteriom. Limfocyty Th2 wytwarzają IL-4 i -5, IL-9 i -13, które są zaangażowane w obronę przeciw pasożytom oraz w zapalenie alergiczne [27]. Przykładem czynnika wpływającego na różnicowanie limfocytów jest IL-12 wytwarzana głównie przez makrofagi. Pobudza ona różnicowanie limfocytów Th0 w kierunku Th1, podczas gdy jej niedobór sprzyja generowaniu większej liczby limfocytów Th2.

Granulocyty kwasochłonne (eozynofile) zawdzięczają swoją nazwę intensywnemu wybarwianiu przez eozyne. W świetle mikroskopu w eozynofilach widoczne jest charakterystyczne dwupłatowe jądro oraz znajdujące się w cytoplazmie ziarnistości zawierające różnorodne mediatory [49]. W odpowiedzi na stymulację komórki te uwalniają m.in. toksyczne białka, wolne rodniki tlenowe, cytokiny (IL-2, -4, -5, -6, TNF- $\alpha$ ), chemokiny (RANTES, eotaksyna) i czynniki wzrostu (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) [47]. Eozynofile są zaangażowane w zwalczanie zakażeń pasożytniczych, ale przede wszystkim przypisuje się im bardzo ważną rolę w przebiegu reakcji alergicznych i rozwoju chorób o takim podłożu. Granulocyty kwasochłonne są obecne w oskrzelach u większości chorych na astmę. W wycinkach błony śluzowej oskrzeli tych chorych stwierdza się zwiększoną liczbę pobudzonych eozynofilów [18], znajdujących się w nabłonku dróg oddechowych oraz pod błoną podstawną [89]. U astmatyków odsetek tych komórek w płwocinie wydaje się czułym markerem stanu zapalnego w drogach oddechowych [133]. Mediatory uwolnione z pobudzonych eozynofilów mogą wywołać skurcz mięśniówki gładkiej oskrzeli [134], zwiększać przepuszczalność naczyń mikrokrążenia [29], a także powodować nadreaktywność oskrzeli [96].

Granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) rozmiarem są podobne do eozynofilów i również mają ziarnistości w cytoplazmie. Ich jądro jest złożone z trzech do sześciu segmentów, a w barwieniu peroksydazą rozróżnić można ziarnistości zasadowe (azurofilne, nieswoiste) i kwaśne (swoiste, eozynofilne, adhesomy). Neutrofile odgrywają ważną rolę w procesach zapalnych i usuwaniu cząstek infekcyjnych. Aktywowane granulocyty obojętnochłonne działają cytotoksycznie na inne komórki i mogą prowadzić do uszkodzenia tkanek. Podczas zakażenia neutrofile z krwi obwodowej z pomocą cząsteczek adhezyjnych podążają do miejsca zapalenia. Niszczenie drobnoustrojów przez te leukocyty zachodzi przez uwolnienie dużej ilości rodników tlenowych i innych czynników zawartych w ziarnistościach. Neutrofile mogą wydelać różnorodne enzymy, w tym proteazy rozkładające składniki substancji międzykomórkowej np. metaloproteinazę 9 macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-9) i elastazę, a także cytokiny i chemokiny (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8) [41,102,107]. U chorych na ciężką astmę przewlekłą liczba neutrofilów

w drogach oddechowych zwiększa się w czasie wirusowych zakażeń układu oddechowego lub w wyniku kontaktu z zanieczyszczeniami powietrza. Udział tych komórek w procesach patofizjologicznych w ciężkiej astmie wymaga jednak wyjaśnienia [173].

Mastocyty są komórkami wyspecjalizowanymi w wydzielaniu wielu mediatorów w tkankach, szczególnie w naczyniach krwionośnych, nerwach i nabłonku. Odgrywają one ważną rolę w swoistej i wrodzonej odporności, a także w alergicznym stanie zapalnym związanym z IgE. Komórki tuczne występują w oskrzelach u osób zdrowych i u chorych na astmę [20,37]. Mikroskopia elektronowa i oznaczenie poziomu mediatorów mastocytów w BAL-u potwierdziły degranulację tych komórek w astmie [23,88]. Oprócz uwalniania mediatorów o charakterze autakoidów, mastocyty dróg oddechowych są ważnym źródłem proteaz obojętnych, zwłaszcza tryptazy, wykazujących różne działanie na białka, w tym zdolność aktywacji receptorów.

#### **METODY UZYSKIWANIA LEUKOCYTÓW PŁUCNYCH**

Leukocyty płucne stanowią charakterystyczną populację komórek pochodzących bezpośrednio z miejsca toczących się procesów zapalnych i odpornościowych. Populacja tych komórek jest cennym materiałem do badań i diagnozowania chorób płuc. Analiza samego składu komórkowego populacji leukocytów płucnych może być ważnym wskaźnikiem charakteru przebiegającej reakcji zapalnej. Leukocyty płucne do badań można uzyskać wykorzystując różne techniki izolacji. Pierwsza z metod polega na izolacji komórek ze skrawków płuc pochodzących z biopsji. Tkanę rozdrabnia się na skrawki i po odpowiedniej obróbce uzyskuje się zawiesinę komórek [78]. Dzięki tej technice możliwe są badania populacji komórek obecnych w obrębie nabłonka dróg oddechowych. Materiał biopsyjny do analiz uzyskuje się w badaniu bronchoskopowym, w którym uzyskać można również popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (bronchoalveolar lavage – BAL). Płukanie pęcherzyków płucnych i oskrzeli polega na wprowadzeniu przez drogi oddechowe do płuc sterylnego i ogrzanego roztworu PBS za pomocą przewodu bronchoskopu, a następnie odessaniu tego płynu [118]. Wraz z płynem z pęcherzyków, nabłonków i przegród międzypęcherzykowych usuwane są komórki rezydujące, a także „naciekające” do światła dróg oddechowych [68]. Przyjmuje się, że wyizolowane z popłuczyn leukocyty reprezentują komórki obecne zarówno w centralnych, jak i w peryferyjnych drogach oddechowych. Komórki uzyskane tą metodą mogą służyć jako materiał do badań w warunkach *ex vivo* nad ich funkcją w organizmie. Badanie płynu z popłuczyn (bronchoalveolar lavage fluid – BALF) może dostarczać wielu informacji dotyczących poziomu enzymów, cytokin i innych markerów reakcji zapalnej (np. złuszczonej cząsteczek adhezyjnych), a także materiału genetycznego obecnego w strukturach pęcherzykowych.

Innym źródłem leukocytów płucnych do badań, stanowiącym alternatywę do przedstawionych technik, jest indukowana płwocina. Jest ona uzyskiwana po wdychaniu rozpylonego hipertonicznego roztworu soli fizjologicznej. Podobnie jak w przypadku BAL, z indukowanej płwociny uzyskiwane są komórki obecne w świetle dróg oddechowych, jednak reprezentują one populację leukocytów pochodzących

z centralnych dróg oddechowych [5]. Chociaż metoda I.S. była stosowana już w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku [73,95], to zainteresowanie indukowaną płwociną jako źródłem komórek w badaniach chorób układu oddechowego wzrosło od czasu ukazania się w 1992 r. artykułu Pin i wsp. [132]. Pojawiło się wiele publikacji donoszących o udoskonaleniu samej metody [65] i świadczących o jej przydatności w badaniach procesów zapalnych toczących się w drogach oddechowych. Komórki z indukowanej płwociny izoluje się przez inkubację w obecności czynników rozpuszczających śluz (dwutiotreitol) i zmniejszających lepkość przez usuwanie DNA z rozpadłych komórek (deoksyrybonukleaza I). Niewątpliwą zaletą indukowanej płwociny jest jej mniejsza inwazyjność w porównaniu z przedstawionymi wcześniej technikami. Istnieje jednak możliwość wystąpienia po inhalacji skurczu oskrzeli, dlatego wykonywanie indukcji płwociny jest poprzedzone inhalacją  $\beta_2$ -mimetyku i wymaga monitorowania stanu chorego w czasie zabiegu.

Przedstawione metody uzyskiwania komórek umożliwiają badania leukocytów płucnych i ich produktów wytwarzanych bezpośrednio w miejscach toczących się procesów zapalnych. Badania prowadzone w tym zakresie mogą się przyczynić do lepszego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw chorób układu oddechowego m.in. astmy oskrzelowej.

#### **ASTMA OSKRZELOWA**

##### **Definicja i czynniki ryzyka**

Astma oskrzelowa jest chorobą powszechnie występującą na całym świecie – szczególnie w krajach o wysokim stopniu rozwoju. W ostatnich trzech dekadach obserwuje się zwiększoną zapadalność na nią i śmiertelność spowodowaną tym schorzeniem [122]. Mimo rozwoju badań i stosowania nowych terapii [66,167], astma i jej zaostrzenia są nadal jednym z głównych powodów hospitalizacji ludzi w każdym wieku. W 1993 r. utworzono Światową Inicjatywę Zwalczenia Astmy (Global Initiative for Asthma – GINA). Cele i założenia tego programu opisano w 1995 r. w Raporcie NHLBI/WHO „Światowa strategia rozpoznawania, leczenia i prewencji astmy” [122]. Raport i towarzyszące mu dokumenty, opracowane przez ekspertów z wielu krajów i placówek badawczych, są nadal aktualizowane w oparciu o wyniki badań naukowych. Dane te zostały opublikowane i udostępnione na oficjalnej stronie GINA w Internecie, dzięki czemu są szeroko rozpowszechnione na świecie i stanowią cenne źródło informacji. Definicja astmy opracowana w 1997 r. kładzie nacisk na zapalne podłoże choroby [61]. Pełna definicja tej choroby brzmi następująco: „Astma jest przewlekłą chorobą zapalną oskrzeli. Fakt ten ma implikacje diagnostyczne, terapeutyczne i zapobiegawcze. Obraz immunohistopatologiczny astmy obejmuje złuszczenie nabłonka oskrzeli, złogi kolagenu pod błoną podstawną nabłonka, obrzęk, pobudzenie mastocytów, nacieki z komórek zapalnych – neutrofilów (zwłaszcza w gwałtownych, śmiertelnych zaostrzeniach astmy), eozynofiliów, limfocytów (Th2). Proces zapalny toczący się w ścianie oskrzeli jest odpowiedzialny za nadreaktywność oskrzeli, ograniczenie przepływu powietrza w drogach oddechowych, objawy ze strony układu oddechowego oraz przewlekły charakter choroby. Zapalenie

w ścianie oskrzeli powoduje ostry skurcz i obrzęk ściany oskrzeli, tworzenie czopów śluzowych oraz przebudowę ściany oskrzeli – zmiany te prowadzą do obturacji oskrzeli. Atopia, genetyczna predyspozycja do rozwoju IgE-zależnej odpowiedzi na pospolite alergeny, jest najsilniejszym wykrywalnym czynnikiem sprzyjającym wystąpieniu astmy.” Definicja z raportu GINA 2002 [122] akcentuje dodatkowo najbardziej charakterystyczne objawy choroby: „Asthma jest przewlekłą chorobą zapalną dróg oddechowych, w której uczestniczy wiele komórek i substancji przez nie uwalnianych. Przewlekłe zapalenie jest przyczyną nadreaktywności oskrzeli, prowadzącej do nawracających epizodów świszczącego oddechu, duszności, ściskania w klatce piersiowej i kaszlu, występujących szczególnie w nocy lub nad ranem. Epizodom tym zwykle towarzyszy rozłana obturacja oskrzeli o zmiennym nasileniu, często ustępująca samoistnie lub pod wpływem leczenia”. W raportach z roku 2003 i 2004 definicja ta nie uległa zmianie.

Astmę oskrzelową dzielimy na: astmę atopową (alergiczną, zewnątrzpochodną), w której mechanizm patogenetyczny wynika głównie z reakcji alergenu z IgE oraz astmę nieatopową (niealergiczną, wewnątrzpochodną), w której nie udaje się wykryć udziału znanych alergenów i swoistych IgE w wyzwalaniu choroby. Brak swoistych IgE w astmie nieatopowej jest główną cechą odróżniającą ją od atopowej. Mechanizmy prowadzące do zapalenia dróg oddechowych w astmie niealergiczej są mało poznane, choć dostrzegano podobny udział cytokin i komórek zapalnych w patogenezie obu postaci astmy. Podobnie jak w astmie atopowej, w wycinkach błony śluzowej oskrzeli stwierdzono obecność cytokin zależnych od limfocytów Th2 oraz nacieki komórek zapalnych [67]. Według obecnego stanu wiedzy, najważniejszym czynnikiem ułatwiającym rozwój astmy atopowej jest genetyczne uwarunkowanie, predysponujące do odpowiedzi na alergeny w postaci IgE [97,148]. Jednym z przełomowych wydarzeń w badaniach astmy oskrzelowej było wykazanie przez Burrowsa i wsp. zależności między całkowitym stężeniem IgE w surowicy krwi a ryzykiem zachorowania na astmę [23]. W obrębie ramienia q31-q33 chromosomu 5 znaleziono 5 markerów genetycznych, kontrolujących stężenie całkowitego IgE w sposób niezależny od antygenu i związanych najprawdopodobniej z ryzykiem zachorowania na astmę oskrzelową. Odpowiedzialne za to są geny IL-4 i -13 [9,111]. Na tym samym chromosomie zidentyfikowano również geny innych cytokin uczestniczących w przewlekłym zapaleniu alergicznym, takich jak IL-3, -5, i GM-CSF. Nie są to jednak jedyne geny, które wiążą się z większym ryzykiem zachorowania na astmę. Wykazano, że istnieją też zależności między występowaniem astmy a chromosomami 6p, 11q, 12q i 13q. Nieliczne doniesienia sugerują jeszcze inne umiejscowienie chromosomalne genów astmy. Należą do nich chromosomy 1, 2q, 3, 7p, 9, 10q, 14, 16, 17q, 19, 20 i 21 [33,175]. Mimo wielu badań, wzajemne związki między podłożem genetycznym a ujawnianiem się atopii nie zostały w pełni wyjaśnione. Do rozwoju choroby, oprócz uwarunkowania genetycznego, niezbędny jest także kontakt z potencjalnym alergenem. Pyłki roślin, roztocza, odchody karaluchów i prusaków oraz sierść zwierząt są najczęstszymi przyczynami ataków astmy atopowej. Współczesny styl życia ludzi w krajach rozwiniętych, gdzie częstość występowania astmy jest największa, sprzyja rozwojowi alergii. Do środowiska wprowadzone zostały np. nowe alergeny pyłkowe.

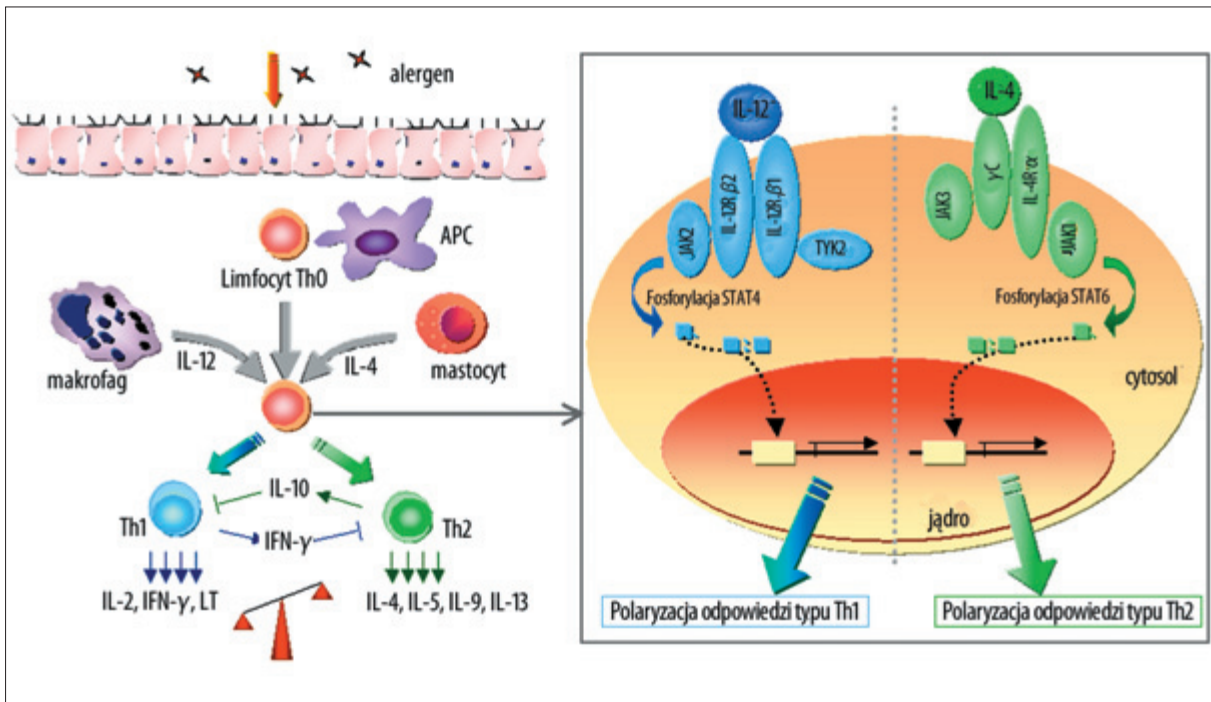
W Europie oprócz pyłków traw i drzew najbardziej popularnych (brzoza, wierzba, topola), uczulają nieznane do tej pory ambrozje i cyprysy. Powszechne stosowanie energooszczędnych okien hamujących cyrkulację powietrza oraz wyścielenie podłóg wykładzinami stwarza dogodny warunki bytowe dla roztoczy żyjących w kurzu, na dywanach, w tapicerce i pluszowych zabawkach. Rozpowszechnione jest również hodowanie różnorodnych zwierząt domowych (zwłaszcza chomików i świnek morskich). Do większości kontaktów chorego na astmę z alergenem może zatem dochodzić w jego własnym mieszkaniu. Postęp cywilizacyjny spowodował znaczne zanieczyszczenie środowiska i chemizację żywności. Czynniki uszkadzające nabłonek dróg oddechowych, takie jak dym tytoniowy lub spaliny z silników dieslowskich, ułatwiają penetrację antygenu i alergizację ustroju. Innymi czynnikami o podobnym działaniu są opary formaldehydu, który może się wydzielać w znacznych stężeniach do powietrza z farb stosowanych do malowania ścian, mebli czy dywanów [144] lub chloramina, znajdująca się w dość dużym stężeniu m.in. w powietrzu na krytych basenach kąpielowych [163].

„Hipoteza higieny” jest jednym z najbardziej popularnych wyjaśnień wzrostu zachorowań na astmę. Według tej teorii wzrost higieny pozytywnie koreluje ze wzrostem zachorowań na astmę. Na przestrzeni ostatniego stulecia zdecydowanie zmniejszyła się liczba infekcji w wieku dziecięcym, co tłumaczy się lepszymi warunkami sanitarnymi i bytowymi, a także z rozpowszechnieniem antybiotyków i szczepień. Zmniejszenie liczby infekcji odpowiada zwiększonej liczbie chorób alergicznym w tym astmy. Interesujące wydają się doniesienia sugerujące, że infekcje wirusowe przebyte w dzieciństwie zmniejszają ryzyko uwrażliwienia na alergen w późniejszym życiu [42,151]. Powtarzające się zakażenia wirusowe we wczesnym dzieciństwie mogą stymulować układ odpornościowy w kierunku odpowiedzi typu Th1, zmniejszając tym samym ryzyko rozwinięcia astmy w wieku szkolnym [69]. Inne badania wykazują również, że antybiotyki podawane podczas infekcji we wczesnym dzieciństwie, wykazują modyfikujący wpływ na mechanizmy obronne i rozwój alergii a w wieku późniejszym także astmy. Badania Cullinana wykazały, że stosowanie antybiotyków w niemowlęctwie zwiększa ryzyko zachorowania na astmę [32].

Nie wszystkie badania potwierdzają jednak „hipotezę higieny”. Badania nad zakażeniami wirusem RS we wczesnym dzieciństwie wskazują, że infekcje te mogą zwiększać wrażliwość na alergeny i podnosić ryzyko rozwinięcia astmy [152,153]. Wydaje się, więc prawdopodobne, że wpływ infekcji wirusowej przebytej we wczesnym dzieciństwie, na obniżenie lub zwiększenie ryzyka zachorowania na astmę zależy od rodzaju patogenu.

### Mechanizmy astmy

Przebiegiem odpowiedzi immunologicznej w każdej postaci astmy kieruje limfocyt T. Jak wcześniej wspomniano, w oparciu o profil cytokin wydzielanych przez klony mysich limfocytów T, Mossman i Coffman wyodrębnił dwa podtypy tych komórek [117]. U myszy, limfocyty Th1 to komórki wytwarzające IFN- $\gamma$ , ale nie IL-4, Th2 zaś wytwarzają IL-4, ale nie IFN- $\gamma$ . Podział ten został przyjęty również do limfocytów ludzkich. Nie odzwierciedla



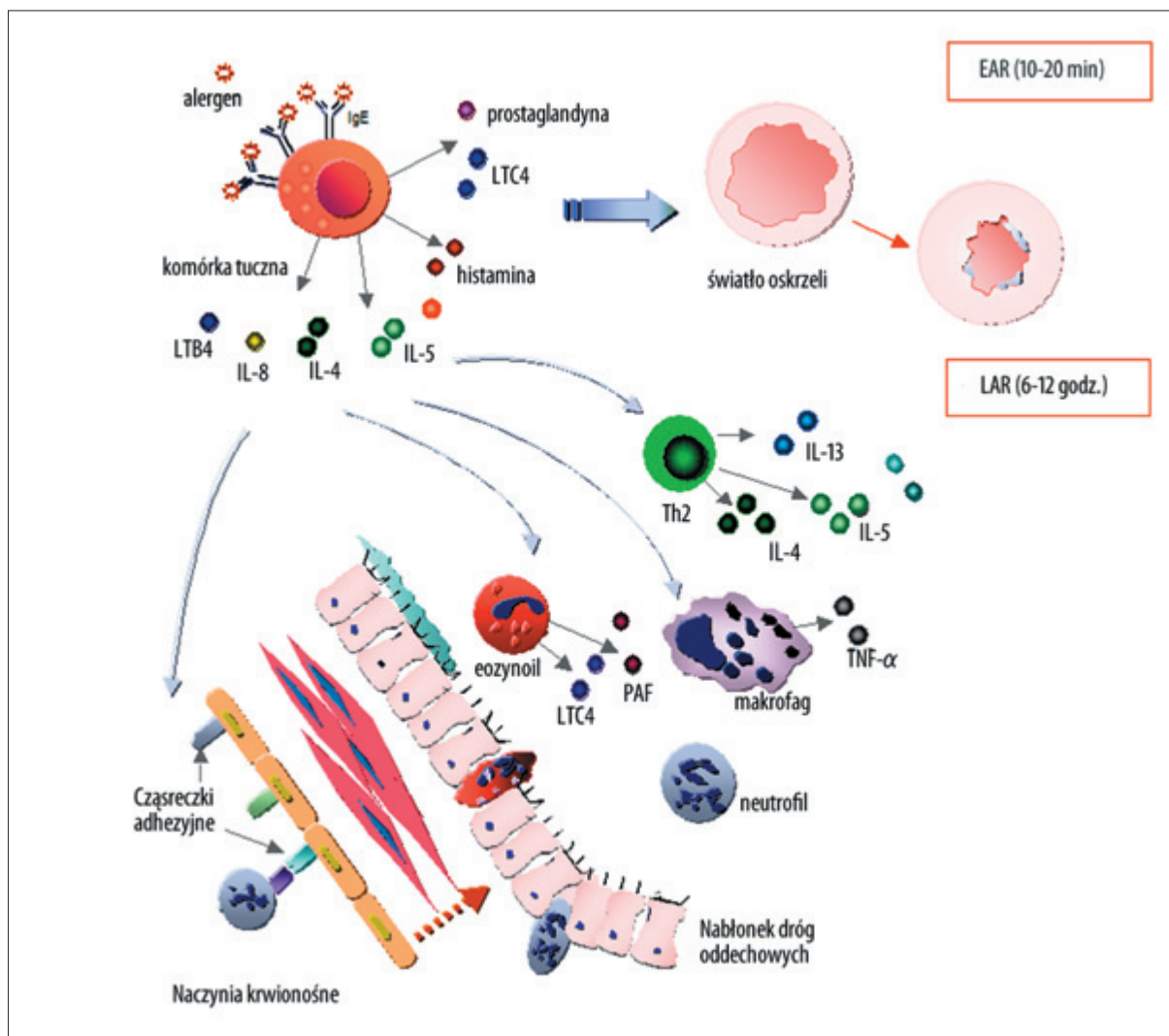
Ryc. 1. Przewaga różnicowania limfocytów w kierunku Th2 w astmie oskrzelowej związana z obniżonym poziomem IL-12; IL-4 stymuluje Jak1 i Jak3 do aktywacji STAT6 uruchamiając szlak transaktywacji genów cytokin i receptorów chemokin związanych z fenotypem Th2. Interakcja IL-12 z receptorem prowadzi do aktywacji Jak2 i Tyk2 a w konsekwencji do fosforylacji Stat4 i ekspresji IFN- $\gamma$  (profil odpowiedzi Th1); na podstawie [130], zmodyfikowane

on jednak dokładnie rzeczywistości, ponieważ u ludzi nie spotyka się komórek wytwarzających tylko jeden określony typ cytokin Th1 lub 2. W zależności od stymulacji komórki T mogą, bowiem wytwarzać zarówno IL-4 jak i IFN- $\gamma$  [28]. Wprowadzenie zróżnicowania limfocytów CD4+ umożliwiło jednak sformułowanie hipotezy, która w uproszczony sposób przez ostatnie lata częściowo tłumaczyła mechanizm astmy oskrzelowej. Rycina 1 przedstawia mechanizmy różnicowania limfocytów Th1/2 pod wpływem cytokin. U chorych obserwuje się zaburzenie w profilu wytwarzanych cytokin. Obniżone wytwarzanie IL-12 przez makrofagi prowadzi do przewagi różnicowania limfocytów Th0 w kierunku Th2 z jednoczesnym niedoborem limfocytów Th1 [140]. Ostatnie doniesienia sugerują także zaangażowanie regulatorowych komórek T w kontrolowanie rozwinęcia astmy i innych chorób alergicznych [2]. Limfocyty Th2 charakteryzują się wytwarzaniem IL-4, -3, -5, -13 i GM-CSF. Za ich pośrednictwem limfocyty te wpływają na docelowe komórki reakcji alergicznej, takie jak: limfocyty B, mastocyty, eozynofile, makrofagi i inne. Wytwarzane przez te komórki mediatory są bezpośrednio odpowiedzialne za rozwój zapalenia alergicznego i objawy obturacji oskrzeli w astmie.

IL-4 (wytwarzana nie tylko przez limfocyty Th2) jest najważniejszą cytokiną reakcji alergicznej – powoduje zmianę izotypu limfocytów B w kierunku wytwarzania IgE, zwiększenie ekspresji naczyniowej cząsteczki przylegania typu 1 (vascular cell adhesion molecule-1 – VCAM-1), kontroluje poziom ekspresji Fc- $\epsilon$  IgE, receptorów cytokin i chemokin oraz liczbę leukocytów biorących udział w kaskadzie zapalenia alergicznego. Interleukina 4 sprzyja również dalszemu różnicowaniu limfocytów Th0 w kierunku Th2

i zwiększaniu wytwarzania IL-4, wzmacniając reakcję alergiczną i wytwarzanie IgE bez udziału alergenu. Ważnym kofaktorem syntezy IgE zależnej od IL-4 jest IL-6, której zwiększone wytwarzanie u chorych na astmę jest dobrze udokumentowane [19,79].

Rozróżniane są dwie fazy reakcji astmatycznej: wczesna (early asthmatic reaction – EAR) i późna (late asthmatic reaction – LAR). Pierwsza występuje po 10–20 min od inhalacji alergenu. Wtedy to dochodzi do pierwszego skurczu oskrzeli. Rycina 2 przedstawia schemat reakcji astmatycznej. W tym czasie z mastocytów wyzwala się mediatory zgromadzone w ziarnistościach, takie jak histamina, enzymy proteolityczne i glikolityczne oraz heparyna, a także wytwarzane *de novo*: prostaglandyna D2, leukotrien C4 (LTC<sub>4</sub>) [174], adenozylna i wolne rodniki tlenowe [30]. Mediatory te wspólnie powodują skurcz mięśni gładkich ścian dróg oddechowych, pobudzenie zakończeń nerwów dośrodkowych, nadmierne wydzielanie śluzu, rozkurcz naczyń krwionośnych i wysięk osocza z naczyń mikrokrążenia. Jednocześnie komórki tłuszczne wydzielają cytokiny mające bezpośredni wpływ na ujawnienie fazy późnej (TNF- $\alpha$ , IL-4, -5, -6) oraz pobudzające migrację innych komórek zapalnych (IL-13 i GM-CSF). Kolejny skurcz oskrzeli następuje po upływie około 6–12 godzin i określany jest jako późna reakcja astmatyczna. Badania ostatnich lat sugerują, że faza późna ma znacznie większy wpływ na patogenezę astmy niż faza wczesna. Mediatory wydzielane przez komórki tłuszczne stanowią silny bodziec ekspresji cząsteczek adhezyjnych na śródbłonku naczyń, które są niezbędne do migracji leukocytów w miejsce zapalenia. U chorych na astmę najważniejszymi molekułami adhezyjnymi zaangażowanymi w przemieszczanie i akty-

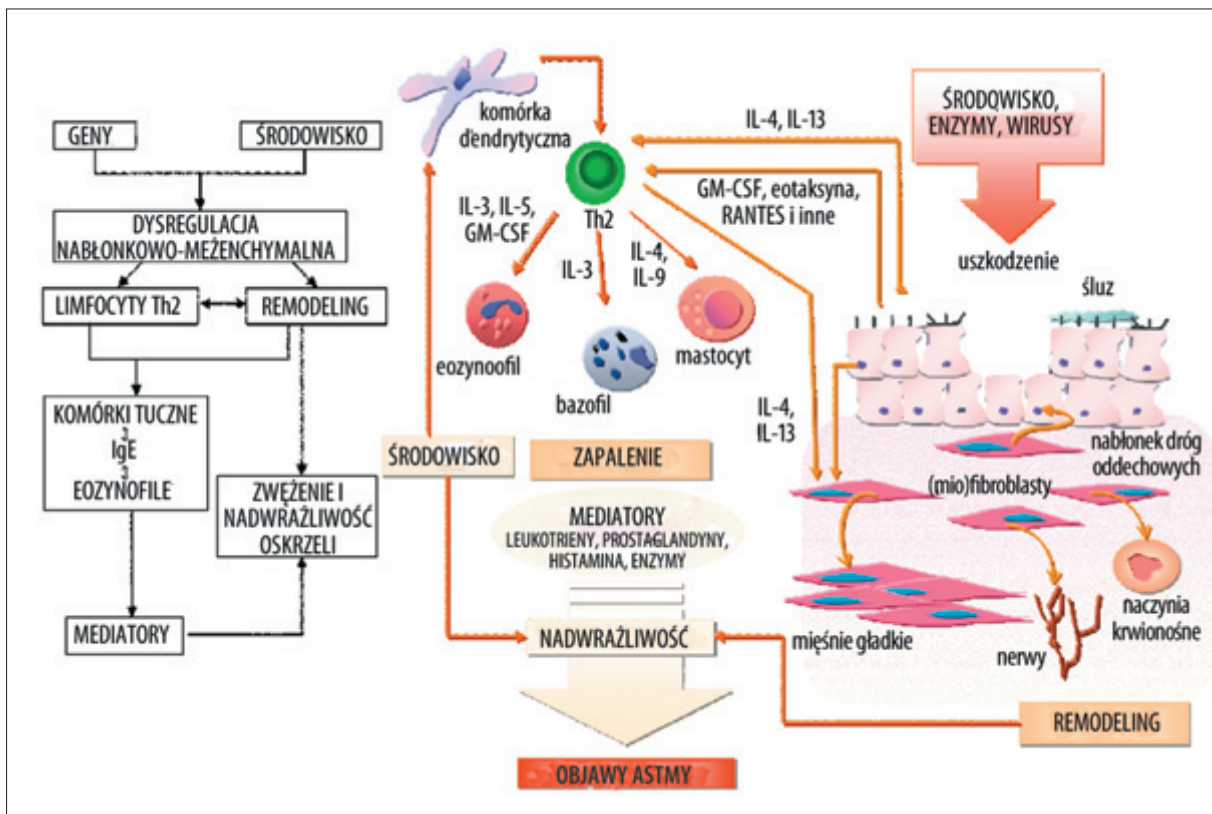


Ryc. 2. Przebieg wczesnej (EAR) i późnej (LAR) fazy reakcji astmatycznej. Mastocyty po związaniu na swojej powierzchni IgE z alergenem, wydzielają mediatory (histamina, prostaglandyna, leukotrieny, kininy) odpowiedzialne za skurcz oskrzeli, nadmierne wydzielanie śluzu oraz rozkurcz naczyń krwionośnych. Jednocześnie komórki tłuszczne wydzielają cytokiny mające bezpośredni wpływ na ujawnienie fazy późnej (TNF- $\alpha$ , IL-4, -5, -6) oraz pobudzenie migracji innych komórek zapalnych (IL-10, -13 i GM-CSF). W odpowiedzi na te czynniki do dróg oddechowych napływają i są aktywowane komórki zapalne. Stan zapalny jest wzmacniany i podtrzymywany wytwarzanymi przez nie mediatorami

wację komórek są: cząsteczka adhezji międzykomórkowej typu 1 (intercellular adhesion molecule 1 – ICAM-1), VCAM-1 i jego ligand VLA-4. Wiązanie cząsteczek przylegania z ich ligandami obecnymi na leukocytach powoduje ich ścisłe przyleganie do śródbłonna naczyń mikrokrążenia. Następnie dochodzi do diapedezy, czyli przenikania przez śródbłonek i ukierunkowanej chemokinami migracji w kierunku tkanki.

W fazie późnej, w drogach oddechowych wzrasta liczba eozynofiliów, neutrofilów oraz limfocytów CD4 i CD8. W latach dziewięćdziesiątych dwudziestego wieku sądzono, że za wszystkie rodzaje astmy odpowiedzialne są eozynofile. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia sugerujące, iż eozynofile nie we wszystkich przypadkach astmy odgrywają wiodącą rolę. Obecnie badania wskazują, że tylko część przypadków tej choroby ma tło eozynofilowe [126]. Brak uchwytnej korzyści fizjologicznych i klinicznych stwierdzano po eksperymentalnym zastosowaniu eg-

zogennej IL-12 i IFN- $\gamma$ , które doprowadzały do zmniejszenia liczby eozynofiliów [22]. W innych doświadczeniach nie stwierdzono wpływu na wczesną i późną fazę odpowiedzi na alergen oraz na nadreaktywność oskrzeli po długoterminowym podawaniu monoklonalnego przeciwciała przeciwko IL-5, chociaż liczba eozynofiliów w płwocinie i we krwi zmniejszyła się do prawie niewykrywalnego poziomu [94]. Analiza częstości występowania eozynofiliów w materiałach klinicznych pochodzących od astmatyków, we wszystkich pracach zebranych w bazie Medline od 1995 r., w których te dane były dostępne, wykazała, że tylko 51% przypadków astmy przebiegało z eozynofilią. W pozostałych przypadkach, w materiałach tych, dominowały neutrofile [39]. Inni autorzy wykazali obecność nie-eozynofilowej astmy o etiologii zawodowej spowodowanej ekspozycją na substancje drobnocząsteczkowe. Tylko u około 40% pracowników z astmą zawodową stwierdzono eozynofilię płwociny, natomiast neutrofilia występowała u wszystkich [7].



Ryc. 3. Patogeneza astmy: hipoteza związana z nieprawidłowymi procesami naprawczymi nabłonka dróg oddechowych w odpowiedzi na uszkodzenie. W wyniku działania czynników egzogennych, takich jak alergeny, wirusy i zanieczyszczenie powietrza oraz endogennych np. enzymów proteolitycznych (tryptaza, chymaza i MMP9 pochodzące z mastocytów i eozynofiliów) dochodzi do uszkodzenia nabłonka oskrzeli. U chorych na astmę pobudza ono nasilone mechanizmy naprawcze, których wynikiem są zmiany strukturalne i czynnościowe określane jako przebudowa dróg oddechowych. Nabłonek i znajdująca się poniżej tkanka (EMTU), odpowiadają na uszkodzenie nadmiernym wytwarzaniem czynników wzrostu odpowiedzialnych za włóknienie i stymulujących różnicowanie fibroblastów w kierunku miofibroblastów. Aktywowane miofibroblasty wytwarzaniem różnych czynników wzrostu i cytokiny uczestniczące w procesach włóknienia podnabłonkowego, proliferacji komórek mięśni gładkich oddechowych, zwiększenia sieci nerwowej i przepuszczalności naczyń w drogach oddechowych; na podstawie [8,64], zmodyfikowane

W kierunku nabłonka migrują również komórki tuczne. Ostatnie badania wskazują także na znaczenie komórek nabłonkowych w procesie zapalnym. W odpowiedzi na cytokiny, wydzielane przez limfocyty Th2, wytwarzają one chemokiny pobudzające i podtrzymujące proces zapalny w obrębie tkanek [40]. Ostatnie badania wskazują również na zaangażowanie komórek nabłonka w promowanie różnicowania limfocytów Th2 [48,158]. Utrzymujący się długo proces zapalny prowadzi do wzrostu nadreaktywności oskrzeli na różne nieswoiste bodźce. Napływające komórki zapalne są aktywowane przez uwalniane lub wytwarzane miejscowo czynniki, przez co stają się nadwrażliwe na działanie różnych bodźców. W następstwie pobudzenia tych komórek dochodzi do uwolnienia dalszych mediatorów powodujących kurcz mięśniówki gładkiej, przekrwienie, obrzęk i uszkodzenie śluzówki dróg oddechowych oraz stymulację zakończeń nerwowych.

Równoległe z przewlekłym stanem zapalnym uszkodzenie nabłonka oskrzeli pobudza mechanizmy naprawcze, czego wynikiem są zmiany strukturalne i czynnościowe określane jako przebudowa (remodeling) dróg oddechowych [40]. Proces ten jest równie charakterystyczny dla astmy oskrzelowej, co zapalenie alergiczne. Mediatorzy uwalnia-

ne przez komórki nacieku zapalnego działają szkodliwie na otaczającą tkankę. Udział w procesach uszkodzenia nabłonka dróg oddechowych mają takie czynniki jak: tryptaza, elastaza, metaloproteinazy (MMPs), mieloperoxydaza (MPO) oraz wolne rodniki, w tym tlenek azotu. W przebiegu astmy w wyniku nasilonych procesów naprawczych dochodzi do pogrubienia ścian dróg oddechowych. Jest ono spowodowane zwiększeniem ilości mięśni gładkich w ścianie oskrzeli, obrzękiem, naciekami komórek zapalnych, przerostem gruczołów śluzowych i odkładaniem się tkanki łącznej [98]. W patomechanizmie włóknienia podnabłonkowego ważną rolę odgrywają czynniki wzrostu, takie jak: TGFβ, GM-CSF i PDGF. Inne mediatorzy uczestniczące w tym procesie to: tryptaza, leukotrieny cysteinylowe, MMPs oraz interleukiny IL-1, -4, -5 i -6. Stymulujący wpływ na zwiększenie ilości mięśni gładkich w przebudowie dróg oddechowych wywierają: endotelina 1 (ET-1), PDGF, czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor – EGF), EGF-2, IL-1β, IL-6 oraz tryptaza, histamina i leukotrieny [64]. Zwiększeniu masy mięśni gładkich towarzyszy angiogeneza. W regulację nowotworzenia naczyń zaangażowane są głównie naczyniowo-nabłonkowy czynnik wzrostu (vascular-epithelial growth factor – VEGF) i angioproteina (Ang1) [179].



**Tabela 1.** Geny NOS w komórkach ludzkich [na podstawie 4]

Izofорма NOS	nNOS (NOS I)	iNOS (NOS II)	eNOS (NOS III)
Lokalizacja chromosomalna	chromosom 12 (12q24.2-12q24.3)	chromosom 17 (17cen-q11.2)	chromosom 7 (7q35-7q36)
Struktura	29 eksonów, 28 intronów	26 eksonów, 25 intronów	26 eksonów, 25 intronów
Rozmiar	>200 kbp	37 kbp	21±22 kbp

Według ostatnich doniesień przewlekłe uszkodzenie obejmuje również tkankę płucną [45,171]. Odpowiedzialny za nie jest zstępujący w dół od oskrzelików końcowych alergiczny proces zapalny. Nagromadzenie komórek nacieku zapalnego w peryferyjnych drogach oddechowych stwarza tam możliwość przebiegu procesów, jakie zachodzą podczas uszkodzeń nabłonka oskrzeli. Natomiast niewiele wiadomo na temat mechanizmów naprawczych w tych obszarach płuc.

Odmienne od ogólnie przyjętej hipotezę, dotyczącą patogenezy astmy, zaproponował Holgate'a i wsp. [64]. Sugeruje on, że nadmierne zapalenie i przebudowa dróg oddechowych w astmie, są konsekwencją genetycznie uwarunkowanej zwiększonej podatności komórek nabłonka na apoptozę i nieprawidłowych procesów naprawczych w odpowiedzi na uszkodzenia, u osób wrażliwych na wdychane czynniki środowiskowe. Zmiany takie obserwowane są już u dzieci na ponad cztery lata przed rozwinięciem objawów astmy. Dlatego też Holgate sugeruje, że w patogenezie astmy jednocześnie z zapaleniem fundamentalną rolę odgrywa odpowiedź nabłonkowo-mezenchymalnej jednostki troficznej (epithelial-mesenchymal trophic unit – EMTU) na uszkodzenie nabłonka. Hipoteza ta łączy elementy uwarunkowania genetycznego i środowiskowego rozwinięcia astmy atopowej i nieatopowej. Rycina 3 przedstawia schemat tego paradigmatu.

### Leczenie astmy

W leczeniu astmy stosowane jest leczenie skojarzone, w którym podawane są leki rozkurczowe i przeciwzapalne. Podstawową stosowaną terapią jest terapia glukokortykosteroidowa. Wśród dostępnych obecnie leków przeciwzapalnych związki te uważane są za najsilniejsze i najskuteczniejsze, jednak mechanizmy ich działania nie są całkowicie wyjaśnione. Ze względu na wiele niepożądanych działań glukokortykosteroidów ogólnych, opracowano preparaty podawane miejscowo. Glukokortykosteroidową terapię systemową prowadzi się jedynie w celu szybkiego opanowania choroby lub w leczeniu ciężkiej astmy przewlekłej. W leczeniu długotrwałym stosowane są preparaty wziewne. Glukokortykosteroidy są silnie lipofilne, dlatego też łatwo i szybko przenikają przez błony komórkowe do cytosolu, gdzie wiążą się z receptorami [1]. Kompleks glukokortykosteroid-receptor może wiązać się ze swoistymi fragmentami DNA, którymi są regiony odpowiedzi na glukokortykosteroidy (glucocorticoid responsive element – GRE). Elementy te, w zależności od tego, czy połączenie aktywnego receptora z miejscem odpowiedzi na glukokortykosteroid prowadzi do pobudzenia, czy do zaha-

mowania transkrypcji odpowiednich genów, dzieli się na +GRE (pobudzające) i –GRE (hamujące). Kompleks glukokortykosteroid-receptor, który powstaje w obecności egzogenego glukokortykosteroidu może się wiązać również z czynnikami transkrypcyjnymi: AP-1 (activator protein-1) lub NF-κB (nuclear factor kappa B) w jądrze (w przypadku NF-κB również w cytoplazmie) [113]. W ten sposób zostaje zahamowane działanie tych czynników na poziomie jądra komórkowego. Wykazano również, że glukokortykosteroidy stymulują wytwarzanie inhibitorowych białek IκB [35], które wiążąc się w cytoplazmie z NF-κB zapobiegają jego przemieszczeniu do jądra. Poprzez te mechanizmy glukokortykosteroidy wpływają hamująco zarówno na liczbę, jak i aktywność wydzielniczą wielu komórek biorących udział w procesie zapalnym przebiegającym podczas astmy.

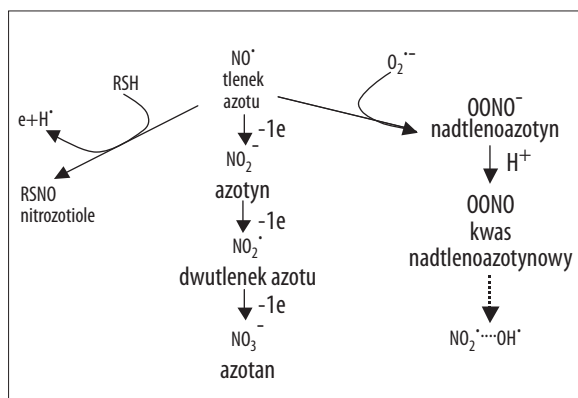
W leczeniu skojarzonym, zazwyczaj jednocześnie, stosowane są wziewny glukokortykosteroid i lek rozszerzający oskrzela. Działanie takie wykazują pochodne adrenaliny – leki z grupy β-2-adrenomimetyków, metyloksantyny (teofilina i aminofilina) oraz leki antycholinonergiczne (bromek ipratropium, bromek oksytropium). Leki przeciwhistaminowe lub inne o działaniu przeciwalergicznym nie są zalecane w podstawowym leczeniu astmy.

### TLENEK AZOTU (NO)

#### Synteza i działanie NO

Tlenek azotu jest bezbarwnym, nieorganicznym gazem, syntetyzowanym z L-argininy z udziałem syntazy tlenku azotu (NOS). Katalizuje ona reakcje utleniania L-argininy do L-cytruliny i tlenku azotu. Obecnie przyjmuje się, że istnieją trzy izofomy tego enzymu. Tabela 1 przedstawia podstawowe informacje dotyczące genów syntaz tlenku azotu w ludzkich komórkach.

Syntazy NO są enzymami zawierającymi w strukturze cząsteczkę hemu i w swej sekwencji podobne są do reduktazy cytochromu P-450 [157]. Wśród kofaktorów niezbędnych do aktywności NOS znajdują się: flawiny (FAD, FMN), tetrahydrobiopteryna i fosforan dwunukleotydu nikotynoadeninowego (postać zredukowana, NADPH). Konstrytutywne syntazy są obecne i stale wytwarzane w śródbłonku naczyń krwionośnych i w płytkach krwi (eNOS) oraz w neuronach ośrodkowego układu nerwowego (nNOS). Są one zależne od stężenia wapnia i kalmoduliny. Wytwarzają małe ilości NO (pmol) w krótkich odstępach czasu w odpowiedzi na stymulację fizjologiczną. Innym przedstawicielem rodziny syntaz tlenku azotu jest niezależna od wapnia, obec-



Ryc. 4. Reakcje przemian NO w komórkach

na w wielu komórkach, indukowalna syntaza NO (iNOS). Enzym ten zlokalizowano w różnych komórkach włączając nabłonek, śródbłonek, neurony, granulocyty kwasochłonne i obojętnochłonne, makrofagi i komórki mięśniówki gładkiej [44,116,121]. Indukowalna syntaza NO może być umiejscowiona w cytosolu lub być związana z błonami. W wyniku działania tego enzymu powstają duże ilości tlenku azotu (nmol). Wytwarzanie aktywnego enzymu jest regulowane przez cytokiny i inne stymulatory układu odpornościowego. Obecność LPS, a także fagocytoza kompleksów antygen-przeciwciała oraz cytokiny, takie jak: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , -6, -12, -18, GM-CSF stymulują wytwarzanie iNOS w komórkach [121,124]. W indukcji ekspresji iNOS, w odpowiedzi na stymulację, uczestniczą m.in. szlak sygnałowy Jak1/Stat1/IRF-1 i czynniki transkrypcyjne: AP-1 i NF- $\kappa$ B [43,55,109,161]. Regulacja aktywności iNOS przebiega na wielu poziomach włączając transkrypcję genów iNOS, stabilizację mRNA, translację mRNA i stabilizację białka; dostępność substratów i kofaktorów. Hamujący wpływ na wytwarzanie iNOS wykazują: IL-4, -8, -10, -13 oraz TGF- $\beta$  [10,123,140]. Ostatnie badania sugerują również hamujący wpływ niektórych wirusów na ekspresję iNOS [13,24]. Ponadto wykazano, że sam tlenek azotu może mieć modulujący wpływ na aktywność iNOS przez interakcje z grupą prostetyczną enzymu w wyniku hamowania czynników transkrypcyjnych [3,129].

Cząsteczka tlenku azotu ma strukturę wolnego rodnika, a okres jej półtrwania wynosi około 3–5 s. Reagując z tlenem tworzy cząsteczkę rodnika  $\text{NO}_2^{\cdot}$ , który w roztworach wodnych tworzy stałe, nieorganiczne metabolity – azotyny ( $\text{NO}_2^-$ ) i azotany ( $\text{NO}_3^-$ ). W obecności  $\text{O}_2^{\cdot-}$  szybko zachodzi reakcja z tlenkiem azotu i powstaje nadtlenoazotyn, który w warunkach fizjologicznych ulega protonacji tworząc kwas nadtlenoazotawy. Kwas ten rozkłada się tworząc silnie utleniające produkty: dwutlenek azotu i rodnik wodortlenowy [54,139]. Rycina 4 przedstawia przykładowe reakcje przemian tlenku azotu w komórce.

Funkcja NO zależy od jego stężenia, miejsca wytwarzania oraz powiązań z innymi cząsteczkami i białkami. Lipofilność cząsteczki sprzyja przenikaniu NO przez błonę komórkową. Powstały w wyniku działania konstytutywnych syntaz tlenek azotu bierze udział w utrzymaniu homeostazy układu krążenia i w przewodnictwie nerwowym [87,103]. Rycina 5 przedstawia mechanizm działania NO w mięśniach gładkich. Zwiększenie stężenia wapnia w komórce śródbłonka

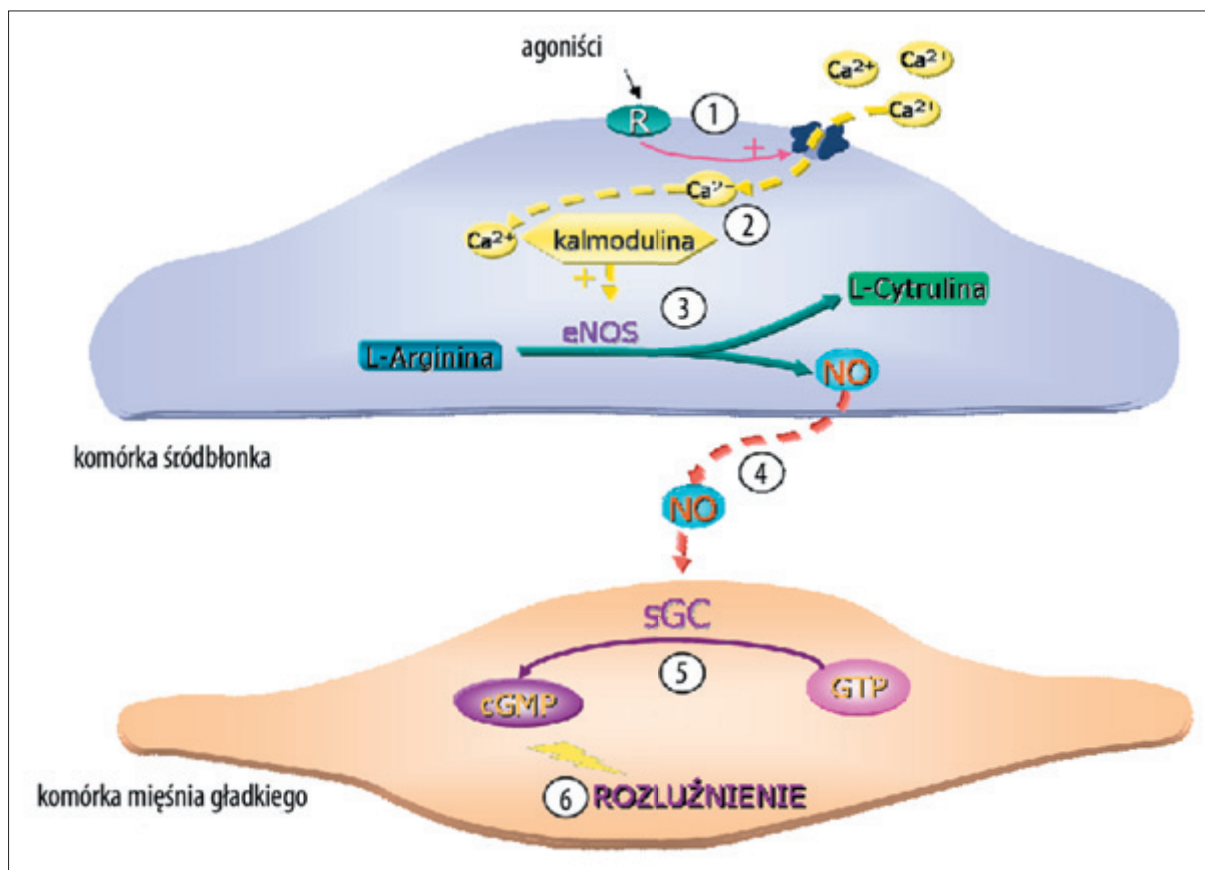
pobudza eNOS do wytwarzania NO. Tlenek azotu przenika przez błony komórkowe i reaguje z żelazem grup prostetycznych hemu w rozpuszczalnej cyklicznej guanylowej (sCG), doprowadzając do zwiększenia stężenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) w komórkach mięśni gładkich. Wzrost stężenia cGMP wywołuje rozkurcz mięśni gładkich oraz rozszerzenie światła żył i tętnic.

Tlenek azotu uwolniony w dużych ilościach przez indukowaną formę NOS, działa cytotoksycznie i cytostatycznie na komórki nowotworowe oraz mikroorganizmy [105,159]. Rycina 6 przedstawia miejsca szkodliwego działania NO w komórkach. Mechanizm cytotoksycznego działania NO w komórkach wynika głównie z jego powinowactwa do grup tiolowych układów oksydoredukcyjnych. Przenikając przez błony komórek docelowych NO szybko łączy się z wolnymi rodnikami tlenowymi. Reaktywne związki azotowe (reactive nitrogen intermediates – RNI) mogą wywierać szkodliwe działanie poprzez: inaktywację i rozszkolenie DNA prowadząc m.in. do mutagenyzy [160], blokowanie enzymów oddechowego cyklu Krebsa [119], a także utlenianie składników błon komórkowych [12].

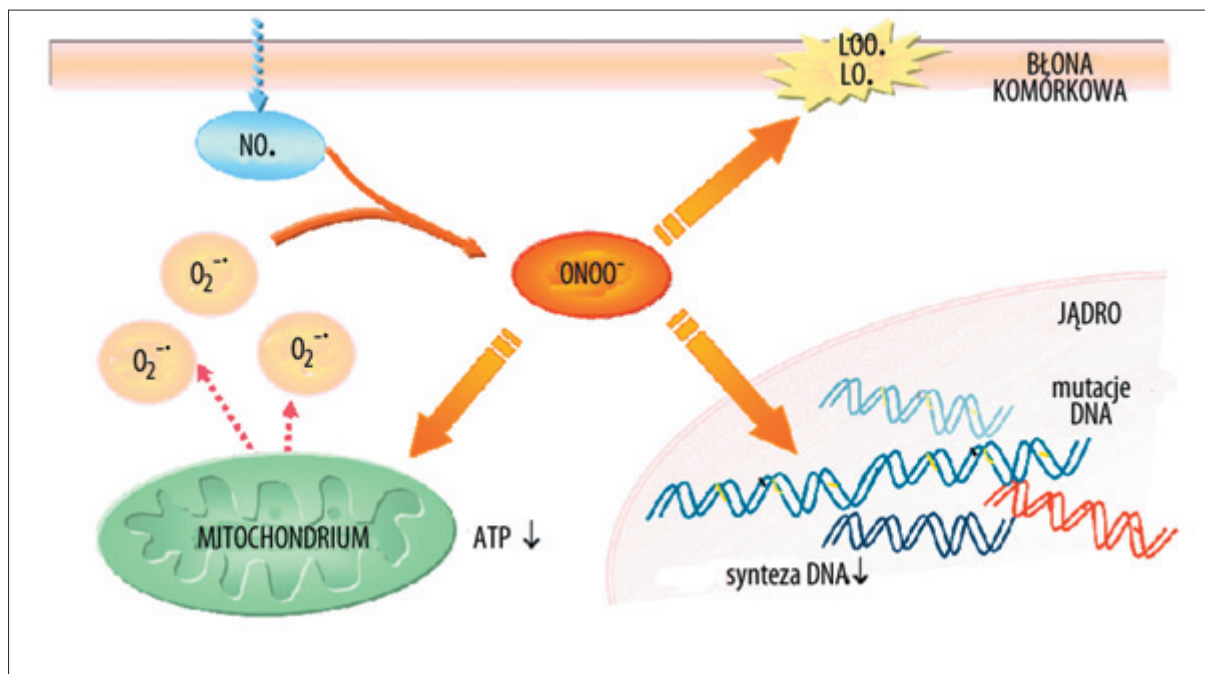
Badania na modelach doświadczalnych wykazują, że NO jest odpowiedzialny za działanie cytotoksyczne wywierane m.in. na bakterie (np. *Salmonella enterica*, *Chlamydia pneumoniae* i *Mycobacterium tuberculosis*) [104,143,149], pasożyty (*Schistosoma mansoni* i *Leishmania major*) [70,100] oraz grzyby (*Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* i *Candida albicans*) [16,52,92]. Tlenek azotu odgrywa również ważną rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej. Znane przeciwwirusowe działanie IFN- $\gamma$  wiąże się z indukcją przez ten interferon iNOS. Karupiasz z zespołem udowodnił, że NO pochodzący z donorów może osłabiać replikację wirusów krowianki (VV), opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1) oraz ekto-melii (EV) [74]. W dalszych doświadczeniach na liniach mysich komórek, a także *in vivo* na modelu mysim, wykazano jego przeciwwirusowe właściwości wobec takich wirusów jak wirus opryszczki, krowianki, Coxsackie i koronawirus [31,58,93,127]. Badania Sandersa wykazały, że tlenek azotu hamuje również replikację rinowirusów i znacząco zmniejsza wytwarzanie cytokin wywołane zakażeniem wirusowym [147].

Aktywne związki azotowe odgrywają znaczącą rolę w odpowiedzi obronnej organizmu nie tylko ze względu na bezpośrednie działanie cytotoksyczne, ale również ze względu na ich działanie immunoregulatorowe. Mogą one m.in. hamować białka G [90], oraz aktywować lub hamować: kinazy [36], kaspazy [108] i metaloproteazy [180]. Przez stabilizację kompleksu I $\kappa$ B $\alpha$  NO może zmniejszać aktywność NF $\kappa$ B i hamować wytwarzanie wielu cytokin i innych mediatorów [15,17]. W tabeli 2 wybrano geny, których transkrypcja jest regulowana przez NF $\kappa$ B.

W warunkach *in vitro* potwierdzono hamujący wpływ NO na wytwarzanie takich cytokin jak: TNF, IL-1, -12 [17,164,177]. Regulując wytwarzanie cytokin i prostaglandyn [60,110] NO może wywoływać lub zapobiegać apoptozie komórek gospodarza [21,84]. Tak szeroki zakres działania czyni z tlenku azotu multifunkcyjną cząsteczkę, zaangażowaną zarówno w pro- jak i przeciwzapalne mechanizmy kontrolujące odpowiedź immunologiczną.



Ryc. 5. Mechanizm rozluźniania mięśni gładkich przez tlenek azotu. Zwiększenie poziomu wapnia w komórce śródbłonka pobudza eNOS do wytwarzania NO (1–3). Tlenek azotu przenika przez błony komórkowe do komórek mięśni gładkich (4). Reakcja NO z żelazem grup prostetycznych hemu w rozpuszczalnej cyklicznej guanylozylcyklazie (sGC) doprowadza do zwiększenia stężenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) w komórkach mięśni gładkich (5–6). Wzrost stężenia cGMP wywołuje rozkurcz mięśni gładkich; na podstawie [114], zmodyfikowane



Ryc. 6. Miejsca szkodliwego działania NO w komórkach docelowych: błony komórkowe – oksydacja lipidów i innych składników błon; mitochondrium – hamowanie aktywności akonitazy oraz I i II kompleksu łańcucha oddechowego, zaburzenie przepływu elektronów umożliwiające formowanie  $O_2^{\cdot -}$ ; jądro – inaktywacja i rozszczepienie DNA

**Tabela 2.** Wybrane geny regulowane przez NF- $\kappa$ B [na podstawie 151]

Typ cząsteczki	Geny	Typy komórek
Czynniki wzrostu	GM-CSF	monocyty/makrofagi
Cząsteczki adhezyjne	ICAM-1 VCAM, Sel-E, Sel-P	komórki błony śluzowej komórki śródbłonka
Cytokiny/chemokiny	IL-1 IL-2 IL-6 IL-8, TNF- $\alpha$ IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , RANTES	komórki B komórki T komórki B i T komórki B, T, makrofagi, monocyty i inne komórki nabłonka dróg oddechowych
Regulatory transkrypcyjne	p53	komórki odpowiedzi zapalnej
Czynniki anty-apoptotyczne	TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1, c-IAP2	komórki odpowiedzi zapalnej
Inne	iNOS, COX2	różne typy komórek

### Udział NO w procesach przebiegających w astmie

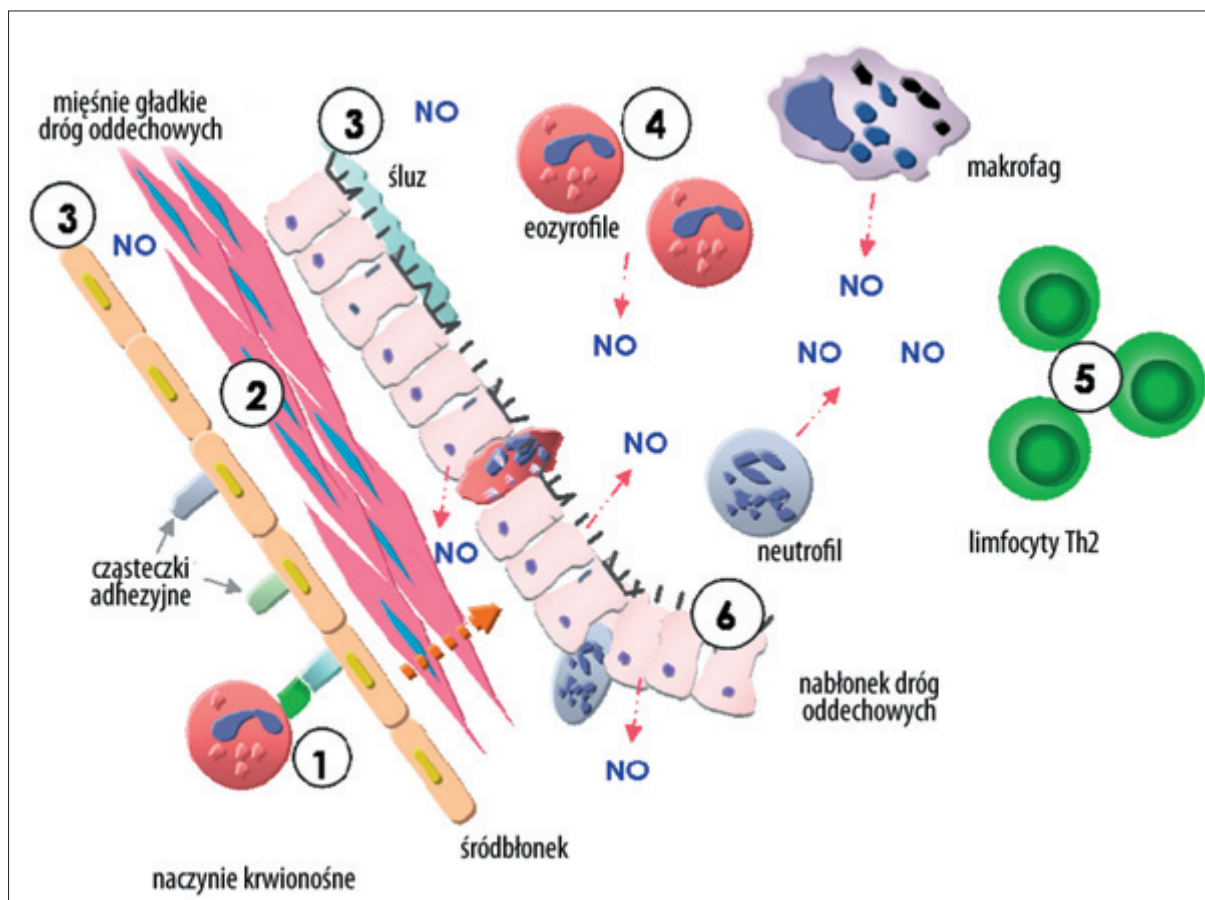
Rola tlenu azotu w patofizjologii astmy jest obecnie przedmiotem dyskusji. Początkowo sądzono, że ze względu na miorelaksacyjne działanie, egzogenne NO będzie wywierał korzystny wpływ podczas skurczów oskrzeli u chorych na astmę [128,142]. Badania, w których pacjentom wziewnie podawano NO nie przyniosły jednak oczekiwanych rezultatów [131,172]. Wykazano natomiast podniesiony poziom ekspresji białka iNOS w komórkach układu oddechowego [56] oraz zwiększone stężenie tlenu azotu w powietrzu wydychanym przez chorych na astmę [6]. Mimo iż związek między „wydychanym” NO a zapaleniem w drogach oddechowych nie został jeszcze ostatecznie określony, jego pomiar został uznany jako użyteczny w monitorowaniu intensywności zapalenia u chorych na astmę [76,156]. Również ostatnie doniesienia wskazują na przydatność oznaczania stężenia metabolitów NO w indukowanej płwocinie u chorych dzieci [85].

Mechanizmy związane z lokalnym wytwarzaniem NO pozostają nie w pełni wyjaśnione, a także nieustalone jest pochodzenie nadmiernej ilości tlenu azotu wydzielanego przez chorych na astmę. Immunohistochemiczne barwienia biopsji ludzkich oskrzeli wykazały, że zwiększenie poziomu tlenu azotu w astmie odpowiada zwiększonej ekspresji indukowanej NOS [56,145]. Hybrydyzacja *in situ* i techniki immunohistochemiczne pozwoliły zlokalizować syntazy tlenu azotu w różnych komórkach płuc włączając nabłonek, śródbłonek, neurony, granulocyty kwasochłonne i obojętnochłonne, makrofagi i komórki mięśniówki gładkiej [34,44]. Badania prowadzone do tej pory koncentrują się głównie na komórkach nabłonka dróg oddechowych jako istotnym źródle NO w drogach oddechowych astmatyków [38,91]. Nieliczne dane dotyczą natomiast udziału leukocytów płucnych w wytwarzaniu tej cząsteczki [14,165,176]. Korelację między zawartością eozynofili w indukowanej płwocinie a stężeniem NO w powietrzu wydychanym przez chorych na astmę wykazał Mattes i wsp. [112]. Lim [101] sugeruje jednak, że stężenie wydychanego NO i eozynofilia odzwierciedlają różne aspekty zapalenia w drogach oddechowych u tych pacjentów.

Również w granulocytach obojętnochłonnych zostało potwierdzone w warunkach *in vitro* zwiększone wydzielanie NO w astmie [14,136]. Jak wspomniano, obecne wyniki wskazują, że część przypadków tej choroby przebiega z neutrofilią. [126]. Zwiększona liczba granulocytów obojętnochłonnych wiązana jest też z cięższym przebiegiem choroby [71]. Według Greena i wsp. wśród chorych na astmę można wyodrębnić grupę pacjentów, u których dominuje neutrofilowy stan zapalny dróg oddechowych i osoby te słabiej odpowiadają na leczenie glukokortykosteroidami podawanymi drogą wziewną [53].

Działanie tlenu azotu zależy w głównej mierze od jego stężenia i miejsca wytwarzania, to znacznie utrudnia jednoznaczne określenie jego roli w przebiegu astmy. Tlenek azotu może bowiem działać rozszerzająco na naczynia, jako neuroprzebiegacz oraz regulator odpowiedzi immunologicznej [123,138]. Niektóre badania sugerują, że NO uwalniany z mięśni gładkich układu oddechowego hamuje białka sygnałowe komórek odpowiedzi zapalnej, natomiast inne, przeciwnie, wykazują jego zaangażowanie w stan zapalny przez formowanie toksycznych reaktywnych związków azotowych (RNI) [137,146,169]. Rycina 7 przedstawia prawdopodobne miejsca działania tlenu azotu w procesach zachodzących podczas astmy oskrzelowej.

W fazie wczesnej, po reakcji z alergenem i degranulacji komórek tucznych, kiedy pojawiają się mediatory wywołujące skurcz oskrzeli, tlenek azotu znosi ich działanie rozluźniając gładkie mięśnie oddechowe poprzez interakcje z cGMP [63]. Jednocześnie jednak, zwiększa on przepuszczalność naczyń i wydzielanie śluzu zalegającego w drogach oddechowych. Działając rozszerzająco na naczynia krwionośne tlenek azotu zwiększa dostępność mediatorów zapalnych. W dużych stężeniach, może powodować uszkodzenie nabłonka i podrażnienie zakończeń nerwowych prowadzące do nasilenia skurczu oskrzeli. Cytotoksyczne działanie NO na komórki nabłonka dróg oddechowych opisano na podstawie badań *in vitro* z zastosowaniem donorów NO, a także *in vivo*, w których tlenek azotu podawano drogą wziewną [62]. Możliwe, że NO wytwarzany przez leukocyty płucne stymuluje te komórki do wytwarzania czynników bezpośrednio uszkadzających nabłonek lub prowadzących do



Ryc. 7. Prawdopodobne działanie NO w astmie oskrzelowej: 1) zwiększenie napływu eozynofili z krwi do dróg oddechowych, 2) rozluźnienie mięśni gładkich podczas skurczu w EAR, 3) nasilenie wydzielania śluzu w drogach oddechowych i zwiększenie przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych, 4) zahamowanie apoptozy eozynofili, 5) polaryzacja odpowiedzi zapalnej w kierunku Th2, 6) uszkodzenie nabłonka dróg oddechowych

wzmoczonego wytwarzania cytotoksycznych ilości NO w samych komórkach nabłonka. Wiadomo np, że NO może aktywować metaloproteinazy, których rola w procesie uszkodzenia tkanek jest dobrze udokumentowana [180]. Obecnie zwiększa się liczba doniesień, w których pisze się o udziale tlenu azotu w procesach prowadzących do remodelingu dróg oddechowych u chorych na astmę [106, 125].

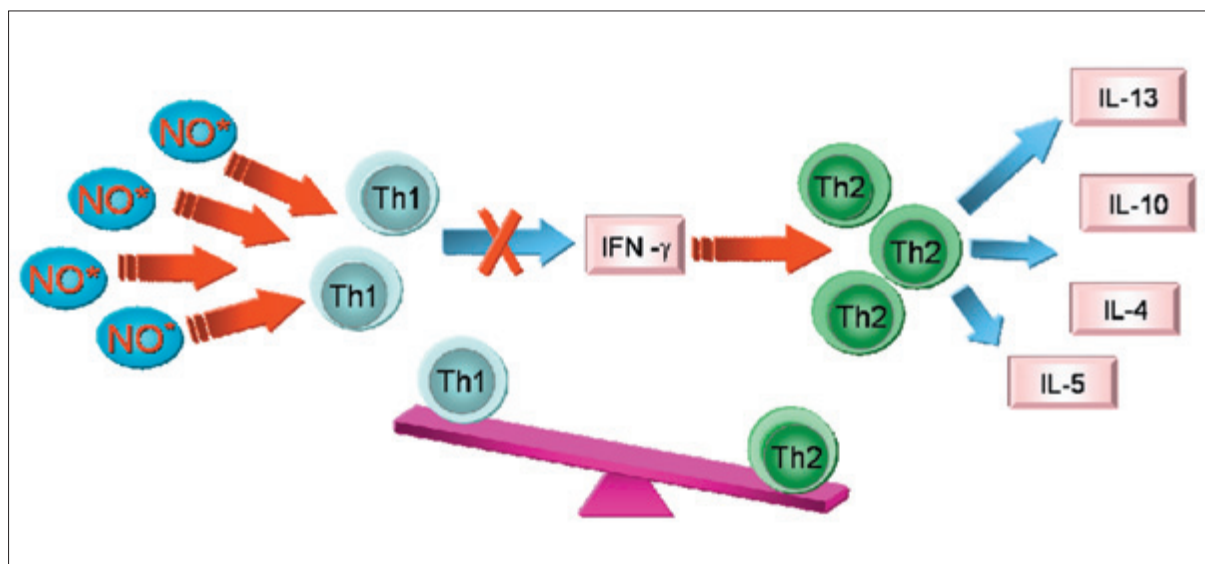
Przypuszcza się, że w astmie tlenek azotu może modylować odpowiedź zapalną np. przez interakcje z NF- $\kappa$ B. W makrofagach płucnych wytwarzanie zapalnych cytokin i aktywacja tego czynnika transkrypcyjnego są hamowane przez chemiczne donory NO [137,166]. Poziom NF- $\kappa$ B, w komórkach uzyskanych z BAL chorych na astmę, jest obniżony w porównaniu ze zdrowymi i odpowiada zwiększonemu wytwarzaniu NO [166]. Ponieważ NF- $\kappa$ B jest zaangażowany w wytwarzanie cytokin zapalnych w drogach oddechowych, Tomassen i Raychaudhuri wskazują na ochronną funkcję NO w astmie. Regulatorowe działanie NO na funkcje wydzielnicze leukocytów płucnych może przebiegać jednak nie tylko za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych, ale również przez inne interakcje, np. ze strukturami palców cynkowych [80,81].

Doświadczenia na komórkach mysich sugerują, że NO jest zdolny do nasilania odpowiedzi zapalnej w astmie zaburza-

jąc równowagę między komórkami pomocniczymi T [99]. Rycina 8 przedstawia schemat prawdopodobnego wpływu NO na profil odpowiedzi typu Th2. Tlenek azotu hamując proliferację limfocytów Th1 zmniejsza wytwarzanie IFN- $\gamma$ . W konsekwencji dochodzi do zwiększenia proliferacji limfocytów Th2, które wytwarzają cytokiny zaangażowane w rozwój alergicznego stanu zapalnego w astmie: IL-4, -5, -10.

Inne badania przemawiają za tym, że tlenek azotu może mieć również wpływ na migrację komórek zapalnych. Doświadczenia z zastosowaniem inhibitorów wytwarzania NO wykazały jego hamujące działanie na napływ granulocytów obojętnochłonnych, a promujące gromadzenie się granulocytów kwasochłonnych [82,83]. Tlenek azotu wpływając na ekspresję cząsteczek adhezyjnych prawdopodobnie przyczynia się do preferencyjnej adhezji eozynofili w skupiskach zapalnych. Zmniejszony napływ eozynofili do płuc wykazano na modelu astmy u transgenicznym myszy iNOS<sup>-/-</sup> [178].

W astmie czas przeżycia aktywowanych eozynofili jest znacznie dłuższy wskutek zmniejszonej apoptozy [155]. Zaburzenie prawidłowo działającego systemu programowanej śmierci może prowadzić do nadmiernej akumulacji tych komórek. Badania Hebestreita i wsp. wskazują, że tle-



Ryc. 8. Polaryzacja odpowiedzi typu Th2 przez NO. Hamujący wpływ NO na proliferację limfocytów Th1 prowadzi do zmniejszenia poziomu wydzielanego przez nie IFN- $\gamma$ . Sytuacja ta stwarza odpowiednie warunki do wzrostu liczebności limfocytów Th2. Ponadto IL-4 wytwarzana przez te komórki sprzyja dalszemu różnicowaniu limfocytów Th0 w kierunku Th2

nek azotu może zapobiegać apoptozie ludzkich eozynofiliów, zakłócając szlak sygnałowy receptora Fas [59].

Analizy *in situ* komórek dróg oddechowych ludzi chorych na astmę wykazują, że ekspresja iNOS jest redukowana przez glukokortykosteroidy. Po terapii stężenie NO w powietrzu wydychanym przez chorych na astmę, powraca do prawidłowego poziomu [77,154]. Związki te mogą bezpośrednio działać hamująco na indukcję iNOS lub pośrednio – przez supresję prozapalnych cytokin stymulujących wytwarzanie NO. Główne mechanizmy regulacji ekspresji genów indukowalnej syntazy NO przez glukokortykosteroidy nie są znane *in vivo*. Wiadomo natomiast, że *in vitro* związki te hamują ekspresję iNOS na różnych poziomach włączając hamowanie transkrypcji genów, redukcję translacji mRNA i zwiększenie degradacji białka enzymu [46,86,135]. Obecnie są prowadzone badania eksperymentalne nad wyeliminowaniem nadmiernych ilości NO z dróg oddechowych za pomocą inhibitorów syntaz NO. Pierwsze doświadczenia z zastosowaniem nieselektywnych inhibitorów syntaz NO nie były zachęcające, gdyż u zwierząt doświadczalnych doprowadzały do podwyższenia ciśnienia [115,168]. Badania te wykazały natomiast, że niewielkie

ilości NO mają korzystny wpływ i są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Obecnie trwają badania nad wprowadzeniem selektywnych inhibitorów iNOS, które pozwolą ograniczyć wytwarzanie tlenu azotu do konstytutywnego poziomu [10,57]. Możliwe, że związki te okażą się cennym uzupełnieniem glukokortykosteroidów, które zwłaszcza podczas zaostrzeń objawów astmy oskrzelowej wywołanych zakażeniami wirusowymi lub grzybiczymi nie są w pełni skuteczne.

Ocena leukocytów płucnych i ich produktów, w tym tlenu azotu, wytwarzanych bezpośrednio w miejscach toczących się procesów zapalnych jest prowadzona w zawężonym wymiarze ze względu na ograniczoną dostępność materiałów klinicznych i trudności w uzyskiwaniu odpowiedniej liczby komórek do doświadczeń. Jednak badania prowadzone w tym zakresie mogą się przyczynić do lepszego zrozumienia mechanizmów astmy, która mimo znacznego postępu wiedzy wciąż stanowi poważny problem kliniczny i terapeutyczny. Tlenek azotu mający zarówno działanie dobroczynne jak i niekorzystne wydaje się jednym z najważniejszych, lecz niedocenianych mediatorów zapalenia w astmie oskrzelowej.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Adcock I.M.: Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2001; 14: 211–219
- [2] Akbari O., Stock P., De Kruffy R.H., Umetsu D.T.: Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003; 15: 627–633
- [3] Albakri Q.A., Stuehr D.J.: Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide-mediated changes in heme insertion and availability. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 5414–5421
- [4] Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 2001; 357: 593–615
- [5] Alexis N., Soukup J., Ghio A., Becker S.: Sputum phagocytes from healthy individuals are functional and activated: a flow cytometric comparison with cells in bronchoalveolar lavage and peripheral blood. *Clin. Immunol.*, 2000; 97: 21–32
- [6] Alving K., Weitzberg E., Lundberg J.M.: Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur. Respir. J.*, 1993; 6: 1368–1370
- [7] Anees W., Huggins V., Pavord I.D., Robertson A.S., Burge P.S.: Occupational asthma due to low molecular weight agents: eosinophilic and non-eosinophilic variants. *Thorax*, 2002; 57: 231–236
- [8] AZ-AIR. International website for respiratory experts. <http://www.az-air.com> (23.11.2005)
- [9] Barnes K.C., Marsh D.G.: The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol. Today*, 1998; 19: 325–332
- [10] Barnes P.J., Hansel T.T.: Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2004; 364: 985–996
- [11] Beck K.F., Eberhardt W., Frank S., Huwiler A., Messmer U.K., Mühl H., Pfeilschifter J.: Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J. Exp. Biol.*, 1999; 202: 645–653

- [12] Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 1620-1624
- [13] Bellows C.F., Garry R.F., Jaffe B.M.: Vaccinia virus-induced inhibition of nitric oxide production. *J. Surg. Res.*, 2003; 111: 127-135
- [14] Bienkowska-Haba M., Cembrzyńska-Nowak M., Liebhart J., Dobek R., Liebhart E., Siemieniec I., Panaszek B., Obojski A., Malolepszy J.: Comparison of leukocyte population from bronchoalveolar lavage and induced sputum in the evaluation of cellular composition and nitric oxide production in patients with bronchial asthma. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2002; 50: 75-82
- [15] Blackwell T.S., Christman J.W.: The role of nuclear factor- $\kappa$ B in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1997; 17: 3-9
- [16] Blasi E., Pitzurra I., Puliti M., Chimienti A.R., Mazzolla R., Barluzzi R., Bistoni F.: Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 1806-1809
- [17] Bogdan C.: Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.*, 2001; 11: 66-75
- [18] Bousquet J., Chanez P., Lacoste J.Y., Barneon G., Ghavanian N., Enander I., Venge P., Ahlstedt S., Simony-Lafontaine J., Godard P., Michel F.B.: Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.*, 1990; 323: 1033-1039
- [19] Bradding P., Roberts J.A., Britten K.M., Montefort S., Djukanovic R., Mueller R., Heusser C.H., Howarth P.H., Holgate S.T.: Interleukins-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal and asthmatic airways, evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1994; 10: 471-480
- [20] Bradley B.L., Azzawi M., Jacobson M., Assoufi B., Collins V.J., Irani A.M., Schwartz L.B., Durham S.R., Jeffery P.K., Kay A.B.: Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1991; 88: 661-674
- [21] Brune B., von Knethen A., Sandau K.B.: Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998; 351: 261-272
- [22] Bryan S.A., O'Connor B.J., Matti S., Leckie M.J., Kanabar V., Khan J., Warrington S.J., Renzetti L., Rames A., Bock J.A., Boyce M.J., Hansel T.T., Holgate S.T., Barnes P.J.: Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, 2000; 356: 2149-2153
- [23] Burrows B., Martinez F.D., Halonen M., Barbee R.A., Cline M.G.: Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *New Engl. J. Med.*, 1989; 320: 271-277
- [24] Cao W., Bao C., Lowenstein C.J.: Inducible nitric oxide synthase expression inhibition by adenovirus E1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 7773-7778
- [25] Cembrzyńska-Nowak M., Szklarz E., Inglot A.D.: Modulation of cytokine production by selenoorganic compound (AE-22) in hyperreactive or hyporeactive bronchoalveolar leukocytes of asthmatics or lung cancer patients. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1997; 17: 609-617
- [26] Cembrzyńska-Nowak M., Szklarz E., Inglot A.D., Teodorczyk-Injeyan J.A.: Elevated release of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993; 147: 291-295
- [27] Chang T.L., Shea C.M., Urioste S., Thompson R.C., Boom W.H., Abbas A.K.: Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. III. Responses of IL-2- and IL-4-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells. *J. Immunol.*, 1990; 145: 2803-2808
- [28] Cohen S.: Cytokine profile data. *Immunol. Today*, 2000; 21: 199-200
- [29] Collins D.S., Dupuis R., Gleich G.J., Bartemes K.R., Koh Y.Y., Pollice M., Albertine K.H., Fish J.E., Peters S.P.: Immunoglobulin E-mediated increase in vascular permeability correlates with eosinophilic inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993; 147: 677-683
- [30] Comhair S.A., Bhatnaga P.R., Dweik R.A., Kavuru M., Erzurum S.C.: Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. *Lancet*, 2000; 355: 624
- [31] Croen K.D.: Evidence for an antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J. Clin. Invest.*, 1993; 91: 2446-2452
- [32] Cullinan P., Harris J., Mills P., Moffat S., White C., Figg J., Moon A., Newman Taylor A.J.: Early prescriptions of antibiotics and the risk of allergic disease in adults: a cohort study. *Thorax*, 2004; 59: 11-15
- [33] Daniels S.E., Bhattacharya S., James A., Leaves N.I., Young A., Hill M.R., Faux J.A., Ryan G.F., le Souef P.N., Lathrop G.M., Musk A.W., Cookson W.O.: A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature*, 1996; 383: 247-250
- [34] del Pozo V., de Arruda-Chaves E., de Andres B., Cardaba B., Lopez-Farre A., Gallardo S., Cortegano I., Vidarte L., Jurado A., Sastre J., Palomino P., Lahoz C.: Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.*, 1997; 158: 859-864
- [35] Deroo B.J., Archer T.K.: Glucocorticoid receptor activation of the I kappa B alpha promoter within chromatin. *Mol. Biol. Cell*, 2001; 12: 3365-3374
- [36] Diefenbach A., Schindler H., Rollinghoff M., Yokoyama W.M., Bogdan C.: Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. *Science*, 1999; 284: 951-955
- [37] Djukanovic R., Wilson J.W., Britten K.M., Wilson S.J., Walls A.F., Roche W.R., Howarth P.H., Holgate S.T.: Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990; 142: 863-871
- [38] Donnelly L.E., Barnes P.J.: Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2002; 26: 144-151
- [39] Douwes J., Gibson P., Pekkanen J., Pearce N.: Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*, 2002; 57: 643-648
- [40] Elias J.A., Zhu Z., Chupp G., Homer R.J.: Airway remodeling in asthma. *J. Clin. Invest.*, 1999; 104: 1001-1006
- [41] Fantone J.C., Ward P.A.: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.*, 1982; 107: 395-418
- [42] Folkerts G., Busse W.W., Nijkamp F.P., Sorkness R., Gern J.E.: Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 157: 1708-1720
- [43] Ganster R.W., Taylor B.S., Shao L., Geller D.A.: Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 8638-8643
- [44] Gaston B., Drazen J.M., Loscalzo J., Stamler J.S.: The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994; 149: 538-551
- [45] Gelb A.F., Licuanan J., Shinar C.M., Zamel N.: Unsuspected loss of lung elastic recoil in chronic persistent asthma. *Chest*, 2002; 121: 715-721
- [46] Geller D.A., Nussler A.K., Di Silvio M., Lowenstein C.J., Shapiro R.A., Wang S.C., Simmons R.L., Billiar T.R.: Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 522-526
- [47] Gienbycz M.A., Lindsay M.A.: Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol. Rev.*, 1999; 51: 213-340
- [48] Gilliet M., Soumelis V., Watanabe N., Hanabuchi S., Antonenko S., de Waal-Malefyt R., Liu Y.J.: Human dendritic cells activated by TSLP and CD40L induce proallergic cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.*, 2003; 197: 1059-1063
- [49] Gleich G.J., Adolphson C.R.: The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv. Immunol.*, 1986; 39: 177-253
- [50] Godard P., Damon M., Chanez P., Michel F.B.: Releasability of airway macrophages in bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1991; 95: 97-101
- [51] Gosset P., Tscopoulos A., Wallaert B., Vannimenus C., Joseph M., Tonnel A.B., Capron A.: Increased secretion by tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1991; 88: 561-571
- [52] Granger D.L., Hibbs J.B., Perfect J.R., Durack D.T.: Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J. Clin. Invest.*, 1990; 85: 264-273
- [53] Green R.H., Brightling C.E., Woltmann G., Parker D., Wardlaw A.J., Pavord I.D.: Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*, 2002; 57: 875-879
- [54] Grisham M.B., Yamada T.: Neutrophils, nitrogen oxides, and inflammatory bowel disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992; 664: 103-115
- [55] Guo F.H., Comhair S.A., Zheng S., Dweik R.A., Eissa N.T., Thomassen M.J., Calhoun W., Erzurum S.C.: Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J. Immunol.*, 2000; 164: 5970-5980

- [56] Hamid Q., Springall D.R., Riveros-Moreno V., Chanez P., Howarth P., Redington A., Bousquet J., Godard P., Holgate S., Polak J.M.: Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet*, 1993; 342: 1510–1513
- [57] Hansel T.T., Kharitonov S.A., Donnelly L.E., Erin E.M., Currie M.G., Moore W.M., Manning P.T., Recker D.P., Barnes P.J.: A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB*, 2003; 17: 1298–1300
- [58] Harris N., Buller R.M., Karupiah G.: Gamma interferon-induced, nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. *J. Virol.*, 1995; 69: 910–915
- [59] Hebestreit H., Dibbert B., Balatti I., Braun D., Schapowal A., Blaser K., Simon H.U.: Disruption of fas receptor signaling by nitric oxide in eosinophils. *J. Exp. Med.*, 1998; 187: 415–425
- [60] Hierholzer C., Harbrecht B., Menezes J.M., Kane J., MacMicking J., Nathan C.F., Peitzman A.B., Billiar T.R., Tweardy D.J.: Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J. Exp. Med.*, 1998; 187: 917–928
- [61] Highlights of the Expert Panel Report 2: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. NIH Publication No. 97-4051A, May 1997. Tekst opublikowano w *Medycynie Praktycznej* nr 1/98
- [62] Ho Y.S., Liou H.B., Lin J.K., Jeng J.H., Pan M.H., Lin Y.P., Guo H.R., Ho S.Y., Lee C.C., Wang Y.J.: Lipid peroxidation and cell death mechanisms in pulmonary epithelial cells induced by peroxynitrite and nitric oxide. *Arch Toxicol.*, 2002; 76: 484–493
- [63] Hogman M., Frostell C.G., Hedenstrom H., Hedenstierna G.: Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993; 148: 1471–1478
- [64] Holgate S.T., Peters-Golden M., Panettieri R.A., Henderson W.R.Jr.: Role of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodelling. *J. Allergy Clin Immunol.*, 2003; 111: S18–S34
- [65] Holtz O., Kips J., Magnussen H.: Update on sputum methodology. *Eur. Respir. J.*, 2000; 16: 355–359
- [66] Horwitz R.J., McGill K.A., Busse W.W.: The role of leukotriene modifiers in the treatment of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 157: 1363–1371
- [67] Humbert M., Menz G., Ying S., Corrigan C.J., Robinson D.S., Durham S.R., Kay A.B.: The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol. Today*, 1999; 20: 528–533
- [68] Hunninghake G.W., Gadek J.E., Kawamami O., Ferrans V.J., Crystal R.G.: Inflammatory and immune process in the human lung in health and disease: Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.*, 1979; 97: 149–206
- [69] Illi S., von Mutius E., Lau S., Bergmann R., Niggemann B., Sommerfeld C., Wahn U., MAS Group: Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *Brit. Med. J.*, 2001; 322: 390–395
- [70] James S.L., Glaven J.: Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J. Immunol.*, 1989; 143: 4208–4212
- [71] Jatakanon A., Uasuf C., Maziak W., Lim S., Fan Chung K., Barnes P.J.: Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999; 160: 1532–1539
- [72] Johnston R.B. Jr.: Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N. Engl. J. Med.*, 1988; 318: 747–752
- [73] Jones F.L. Jr.: The relative efficacy of spontaneous sputa, aerosol-induced sputa and gastric aspirates in the bacteriologic diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Dis. Chest*, 1966; 50: 403–408
- [74] Karupiah G., Xie Q.W., Buller R.M., Nathan C., Durate C., MacMicking J.D.: Inhibition of viral replication by interferon  $\gamma$  induced nitric oxide synthase. *Science*, 1993; 261: 1445–1448
- [75] Kelley J.: Cytokines of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990; 141: 765–788
- [76] Kharitonov S.A., Barnes P.J.: Exhaled markers of pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001; 163: 1693–1722
- [77] Kharitonov S.A., Yates D.H., Barnes P.J.: Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 153: 454–457
- [78] Kikkawa Y., Yoneda K.: The type II epithelial cell of the lung. Method of isolation. *Lab. Invest.*, 1974; 30: 76–84
- [79] Konno S., Gonokami Y., Kurokawa M., Kawazu K., Asano K., Okamoto K., Adachi M.: Cytokine concentrations in sputum of asthmatic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1996; 109: 73–78
- [80] Kroncke K.D.: Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2001; 3: 565–575
- [81] Kroncke K.D., Carlberg C.: Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide. *FASEB J.*, 2000; 14: 166–173
- [82] Kubes P., Kurose I., Granger D.N.: NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in post-ischemic venules. *Am. J. Physiol.*, 1994; 267: H931–H937
- [83] Kubes P., Suzuki M., Granger D.N.: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 4651–4655
- [84] Kuhn K., Shikhan A.R., Lotz M.: Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis. *J. Cell Physiol.*, 2003; 197: 379–387
- [85] Kumar L., Rajput N., Majumdar S.: Nitric oxide metabolites in induced sputum: A noninvasive marker of airway inflammation in asthma. *Indian Pediatr.*, 2005; 7: 329–337
- [86] Kunz D., Walker G., Eberhardt W., Pfeilschifter J.: Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 beta-stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 255–259
- [87] Kuo P.C., Schroeder R.A.: The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann. Surg.*, 1995; 221: 220–235
- [88] Laitinen L.A., Heino M., Laitinen A., Kava T., Haahtela T.: Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1985; 131: 599–606
- [89] Laitinen L.A., Laitinen A., Haahtela T.: Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993; 147: 697–704
- [90] Lander H.M., Hajjar D.P., Hempstead B.L., Mirza U.A., Chait B.T., Campbell S., Quilliam L.A.: A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 4323–4326
- [91] Lane C., Knight D., Burgess S., Franklin P., Horak F., Legg J., Moeller A., Stick S.: Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath. *Thorax*, 2004; 59: 757–760
- [92] Lane T.E., Otero G.C., Wu-Hsieh B.A., Howard D.H.: Expression of inducible nitric oxide synthase by stimulated macrophages correlates with their antihistoplasma activity. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 1478–1479
- [93] Lane T.E., Paoletti A.D., Buchmeier M.J.: Disassociation between the *in vitro* and *in vivo* effects of nitric oxide on a neurotropic murine coronavirus. *J. Virol.*, 1997; 71: 2202–2210
- [94] Leckie M.J., ten Brinke A., Khan J., Diamant Z., O'Connor B.J., Walls C.M., Mathur A.K., Cowley H.C., Chung K.F., Djukanovic R., Hansel T.T., Holgate S.T., Sterk P.J., Barnes P.J.: Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway responsiveness and the late asthmatic response. *Lancet*, 2000; 356: 2144–2148
- [95] Ledwith J.W.: The induced sputum technique for collection of tuberculosis cultures: effectiveness compared to gastric aspiration. *Tuberculos. Thorac. Dis.*, 1965; 23: 12–17
- [96] Leff A.R.: Inflammatory mediation of airway hyperresponsiveness by peripheral blood granulocytes. The case for the eosinophil. *Chest*, 1994; 106: 1202–1208
- [97] Lemanske R.F.Jr., Busse W.W.: Asthma. *J. Am. Med. Assoc.*, 1997; 278: 1855–1873
- [98] Liebhart J.: Przebudowa płuc w astmie. *Pol. Merkuriusz Lek.*, 2003; 14: 524–528
- [99] Liew F.Y., Li Y., Severn A., Millott S., Schmidt J., Salter M., Moncada S.: A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur. J. Immunol.*, 1991; 21: 2489–2494
- [100] Liew F.Y., Millott S., Parkinson C., Palmer R.M., Moncada S.: Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.*, 1990; 144: 4794–4797
- [101] Lim S., Jatakanon A., Meah S., Oates T., Chung K.F., Barnes P.J.: Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. *Thorax*, 2000; 55: 184–188
- [102] Lloyd A.R., Oppenheim J.J.: Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol. Today*, 1992; 13: 169–172



- [103] Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H.: Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.*, 1994; 120: 227–237
- [104] MacMicking J.D., North R.J., LaCourse R., Mudgett J.S., Shah S.K., Nathan C.F.: Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 5243–5248
- [105] MacMicking J., Xie Q., Nathan C.: Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997; 15: 323–350
- [106] Mahut B., Delclaux C., Tillie-Leblond L., Gosset P., Delacourt C., Zerah-Lancner F., Harf A., de Blic J.: Both inflammation and remodeling influence nitric oxide output in children with refractory asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004; 113: 252–256
- [107] Malech H.L., Gallin J.I.: Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N. Engl. J. Med.*, 1987; 317: 687–694
- [108] Mannick J.B., Hausladen A., Liu L., Hess D.T., Zeng M., Miao Q.X., Kane L.S., Gow A.J., Stamler J.S.: Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 1999; 284: 651–654
- [109] Marks-Konczalik J., Chu S.C., Moss J.: Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor  $\kappa$ B-binding sites. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 22201–22208
- [110] Marnett L.J., Wright T.L., Crews B.C., Tannenbaum S.R., Morrow J.D.: Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 13427–13430
- [111] Marsh D.G., Neely J.D., Breazeale D.R., Ghosh B., Freidhoff L.R., Ehrlich-Kautzky E., Schou C., Krishnaswamy G., Beatty T.H.: Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum IgE concentrations. *Science*, 1994; 264: 1152–1156
- [112] Mattes J., Storm van's Gravesande K., Reining U., Alving K., Ihorst G., Henschen M., Kuehr J.: NO in exhaled air is correlated with markers of eosinophilic airway inflammation in corticosteroid-dependent childhood asthma. *Eur. Respir. J.*, 1999; 13: 1391–1395
- [113] McKay L.I., Cidlowski J. A.: Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- $\kappa$ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine Rev.*, 1999; 20: 435–459
- [114] Moncada S., Higgs A.: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 1993; 329: 2002–2012
- [115] Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A.: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.*, 1989; 38: 1709–1715
- [116] Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmac. Rev.*, 1991; 43: 109–142
- [117] Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 1986; 136: 2348–2357
- [118] Myrvik Q.N., Leake E.S., Fariss B.: Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: a technique to procure them in a high state of purity. *J. Immunol.*, 1961; 86: 128–132
- [119] Nagata K., Yu H., Nishikawa M., Kashiba M., Nakamura A., Sato E.F., Tamura T., Inoue M.: *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 14071–14073
- [120] Nathan C.F.: Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, 1987; 79: 319–326
- [121] Nathan C., Xie Q.: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 13725–13728
- [122] NHLBI/WHO Workshop Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention Issued January, 1995, NIH Publication No 02-3659. Uaktualniony raport 2002 udostępniony na stronie [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com), opublikowany w specjalnym wydaniu *Medycyny Praktycznej* 6/2002
- [123] Nussler A.K., Billiar T.R.: Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukocyte Biol.*, 1993; 54: 171–178
- [124] Nussler A.K., Di Silvio M., Billiar T.R., Hoffman R.A., Geller D.A., Selby R., Madariaga J., Simmons R.L.: Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J. Exp. Med.*, 1992; 176: 261–264
- [125] O'Donnell R.A., Frew A.J.: Is there more than one inflammatory phenotype in asthma? *Thorax*, 2002; 57: 566–568
- [126] Ohbayashi H., Shimokata K.: Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy*, 2005; 4: 177–181
- [127] Padalko E., Ohnishi T., Matsushita K., Sun H., Fox-Talbot K., Bao C., Baldwin W.M. III, Lowenstein C.J.: Peroxynitrite inhibition of Coxsackievirus infection by prevention of viral RNA entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 11731–11736
- [128] Pepke-Zaba J., Higenbottam T.W., Dinh-Xuan A.T., Stone D., Wallwork J.: Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet*, 1991; 338: 1173–1174
- [129] Pérez-Sala D., Cernuda-Morollón E., Díaz-Cazorla M., Rodríguez-Pascual F., Lamas S.: Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/cGMP pathway. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2001; 280: F466–F473
- [130] Pernis A.B., Rothman P.B.: JAK-STAT signaling in asthma. *J. Clin. Invest.*, 2002; 109: 1279–1283
- [131] Pfeffer K.D., Ellison G., Robertson D., Day R.W.: The effect of inhaled nitric oxide in pediatric asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 153: 747–751
- [132] Pin I., Gibson P.G., Kolendowicz R., Girgis-Gabardo A., Denburg J.A., Hargreave F.E., Dolovich J.: Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*, 1992; 47: 25–29
- [133] Pizzichini E., Pizzichini M.M., Efthimiadis A., Dolovich J., Hargreave F.E.: Measuring airway inflammation in asthma: Eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997; 99: 539–544
- [134] Rabe K.F., Munoz N.M., Vita A.J., Morton B.E., Magnussen H., Leff A.R.: Contraction of human bronchial smooth muscle caused by activated human eosinophils. *Am. J. Physiol.*, 1994; 267: L326–L334
- [135] Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S.: Glucocorticoids inhibits the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 10043–10047
- [136] Ramesh G., Jindal S.K., Ganguly N.K., Dhawan V.: Increased nitric oxide production by neutrophils in bronchial asthma. *Eur. Respir. J.*, 2001; 17: 868–871
- [137] Raychaudhuri B., Dweik R., Connors M.J., Buhrow L., Malur A., Drabza J., Arroliga A.C., Erzurum S.C., Kavuru M.S., Thomassen M.J.: Nitric oxide blocks nuclear factor- $\kappa$ B activation in alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1999; 21: 311–316
- [138] Ricciardolo F.L.: Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, 2003; 58: 175–182
- [139] Robbins R.A., Grisham M.B.: Nitric oxide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997; 29: 857–860
- [140] Robinson D.S., Hamid Q., Ying S., Tscopoulos A., Barkans J., Bentley A.M., Corrigan C., Durham S.R., Kay A.B.: Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.*, 1992; 326: 298–304
- [141] Roozendaal R., Vellenga E., Postma D.S., De Monchy J.G., Kauffman H.F.: Nitric oxide selectively decreases interferon- $\gamma$  expression by activated human T lymphocytes via a cGmp-independent mechanism. *Immunology*, 1999; 98: 393–399
- [142] Rossaint R., Pison U., Gerlach H., Falke K.J.: Inhaled nitric oxide: its effects on pulmonary circulation and airway smooth muscle cells. *Eur. Heart J.*, 1993; 14 Suppl I: 133–140
- [143] Rottenberg M.E., Gigliotti Rothfuchs A.C., Gigliotti D., Svanholm C., Bandholtz L., Wigzell H.: Role of innate and adaptive immunity in the outcome of primary infections with *Chlamydia pneumoniae*, as analyzed in genetically modified mice. *J. Immunol.*, 1999; 162: 2829–2836
- [144] Rumchev K.B., Spickett J.T., Bulsara M.K., Phillips M.R., Stick S.M.: Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children. *Eur. Respir. J.*, 2002; 20: 403–408
- [145] Saleh D., Ernst P., Lim S., Barnes P.J., Giaid A.: Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB*, 1998; 12: 929–937
- [146] Sanders S.P.: Nitric oxide in asthma. Pathogenic, therapeutic, or diagnostic? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1999; 21: 147–149
- [147] Sanders S.P., Siekierski E.S., Porter J.D., Richards S.M., Proud D.: Nitric oxide inhibits rhinovirus-induced cytokine production and viral replication in human respiratory epithelial cell line. *J. Virol.*, 1998; 72: 934–942
- [148] Sandford A., Weir R., Pare P.: The genetics of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 153: 1749–1765
- [149] Schapiro J.M., Libby S.J., Fang, F.C.: Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 8496–8501

- [150] Senior R.M., Connolly N.L., Cury J.D., Welgus H.G., Campbell E.J.: Elastin degradation by human alveolar macrophages. A prominent role of metalloproteinase activity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989; 139: 1251–1256
- [151] Shaheen S.O.: Changing patterns of childhood infection and the rise in allergic disease. *Clin. Exp. Allergy*, 1995; 25: 1034–1037
- [152] Sigurs N., Bjarnason R., Sigurbergsson F., Kjellman B.: Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000; 161: 1501–1507
- [153] Sigurs N., Bjarnason R., Sigurbergsson F., Kjellman B., Bjorksten B.: Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics*, 1995; 95: 500–505
- [154] Silkoff P.E., McClean P.A., Slutsky A.S., Caramori M., Chapman K.R., Gutierrez C., Zamel N.: Exhaled nitric oxide and bronchial reactivity during and after inhaled beclomethasone in mild asthma. *J. Asthma*, 1998; 35: 473–479
- [155] Simon H.U., Blaser K.: Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? *Immunol. Today*, 1995; 16: 53–55
- [156] Smith A.D., Cowan J.O., Filsell S., McLachlan C., Monti-Sheehan G., Jackson P., Taylor D.R.: Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am. J. Crit. Care Med.*, 2004; 169: 473–478
- [157] Snyder S.H., Bredt D.S.: Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.*, 1992; 266: 68–71, 74–77
- [158] Soumelis V., Reche P.A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B., Gilliet M., Ho S., Antonenko S., Lauerma A., Smith K., Gorman D., Zurawski S., Abrams J., Menon S., McClanahan T., de Waal-Malefyt R.D.R., Bazan F., Kastelein R.A., Liu Y.J.: Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 673–680
- [159] Stuehr D.J., Marletta M.A.: Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985; 82: 7738–7742
- [160] Sugiura Y., Matsumoto T.: Nucleotide-selective cleavage of duplex DNA by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995; 211: 748–753
- [161] Taylor B.S., de Vera M.E., Ganster R.W., Wang Q., Shapiro R.A., Sidney M., Morris J., Timothy R., Billiar T.R., Geller D.A.: Multiple NF- $\kappa$ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 15148–15156
- [162] Thepen T., Kraal G., Holt P.G.: The role of alveolar macrophages in regulation of lung inflammation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1994; 725: 200–206
- [163] Thickett K.M., McCoach J.S., Gerber J.M., Sadhra S., Burge P.S.: Occupational asthma caused by chloramines in indoor swimming-pool air. *Eur. Respir. J.*, 2002; 19: 827–832
- [164] Thomassen M.J., Buhrow L.T., Connors M.J., Kaneko F.T., Erzurum S.C., Kavuru M.S.: Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1997; 17: 279–283
- [165] Thomassen M.J., Kavuru M.S.: Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. *Int. Immunopharmacol.*, 2001; 1: 1479–1490
- [166] Thomassen M.J., Raychaudhuri B., Dweik R.A., Farver C., Buhrow L., Malur A., Connors M.J., Drabza J., Hammel J., Erzurum S.C., Kavuru M.S.: Nitric oxide regulation of asthmatics airway inflammation with segmental allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999; 104: 1174–1182
- [167] Torphy T.J.: Phosphodiesterase isozymes: Molecular targets for novel antiasthma agents. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 157: 351–370
- [168] Vallance P., Collier J., Moncada S.: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, 1989; 2: 997–1000
- [169] van der Vliet A., Eiserich J.P., Shigenaga M.K., Cross C.E.: Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999; 160: 1–9
- [170] Vignola A.M., Chanez P., Chiappara G., Merendino A., Zinnanti E., Bousquet J., Bellia V., Bonsignore G.: Release of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, 1996; 106: 114–119
- [171] Wasserman K.: Is asthma another interstitial lung disease? *Chest*, 2002; 121: 673–674
- [172] Weinberger B., Laskin D.L., Heck D.E., Laskin J.D.: The toxicology of inhaled nitric oxide. *Toxicol. Sci.*, 2001; 59: 5–16
- [173] Wenzel S.E., Szefer S.J., Leung D.Y., Sloan S.I., Rex M.D., Martin R.J.: Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997; 156: 737–743
- [174] Wenzel S.E., Westcott J.Y., Smith H.R., Larsen G.L.: Spectrum of prostanoid release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control groups. An alteration in the ratio of bronchoconstrictive to bronchoprotective mediators. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989; 139: 450–457
- [175] Wiesch D.G., Meyers D.A., Bleecker E.R.: Genetics of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999; 104: 895–901
- [176] Wink D.A., Feelisch M., Fukuto J., Chistodoulou D., Jourdeuil D., Grisham M.B., Vodovotz Y., Cook J.A., Krishna M., DeGraff W.G., Kim S., Gamson J., Mitchell J.B.: The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998; 351: 66–74
- [177] Xiong H., Zhu C., Li F., Hegazi R., He K., Babyatsky M., Bauer A.J., Plevy S.E.: Inhibition of interleukin-12 p40 transcription and NF- $\kappa$ B activation by nitric oxide in murine macrophages and dendritic cells. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 10776–10783
- [178] Xiong Y., Karupiah G., Hogan S.P., Foster P.S., Ramsay A.J.: Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J. Immunol.*, 1999; 162: 445–452
- [179] Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J., Holash J.: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000; 407: 242–248
- [180] Zhang Z., Kolls J.K., Oliver P., Good D., Schwarzenberger P.O., Joshi M.S., Ponthier J.L., Lancaster J.R. Jr.: Activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 15839–15844