

(22)

Biosynteza tlenu azotu i jego funkcje w organizmie

Biosynthesis of nitric oxide and its function in organism

Katarzyna Komaszko^{1,2}, Renata Zalewska¹, Zofia Mariak¹, Róża Julia Wiśniewska²

¹ Z Kliniki Okulistyki Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Zofia Mariak

² Z Zakładu Farmakologii Akademii Medycznej w Białymstoku
P.o. kierownik: dr hab. Róża Julia Wiśniewska

Summary: Nitric oxide (NO) is a gas with diverse biological activities produced from L-arginine by nitric oxide synthetase (NOS). This article provides a short overview of the basic function of NO which takes part in smooth muscle relaxation, neurotransmission, modulation of inflammation in a number of tissues and pathological conditions. The discovery of these new physiological and pathological pathways allows for better understanding of many complex processes. It opens a new field for better treatment of many diseases.

Słowa kluczowe: tlenek azotu, syntaza tlenu azotu, neurotransmisja.

Key words: nitric oxide, nitric oxide synthetase, neurotransmission.

Tlenek azotu (NO) jest gazem o złożonej aktywności biologicznej produkowanym z L-argininy z udziałem syntaz tlenu azotu. Artykuł zawiera krótki przegląd podstawowych funkcji NO, który uczestniczy w relaksacji mięśni gładkich, neurotransmisji, modulacji stanu zapalnego i w wielu innych procesach patologicznych. Odkrywanie coraz to nowych fizjologicznych i patofizjologicznych ścieżek przemian pozwala na lepsze rozumienie wielu skomplikowanych procesów. Stwarza to nowe możliwości w leczeniu wielu chorób.

Ogłoszenie w 1992 r. przez tygodnik „Science” informacji, że tlenek azotu jest „cząstką roku”, podkreśliło wagę i znaczenie dokonanych wcześniej odkryć i zachęciło badaczy do dalszych poszukiwań i analizy ścieżek metabolicznych, którym podlega w ustroju ten niezwykle gaz.

Tlenek azotu (NO) jest nieorganicznym gazem wolnorodnikowym, który powstaje w atmosferze podczas wyładowań elektrycznych. Przez wiele lat uważany był jedynie za toksyczny składnik spalin, dymu tytoniowego, zanieczyszczeń powietrza i produkt uboczny metabolizmu bakterii. Pionierskie badania, prowadzone w latach 80. ubiegłego wieku wykazały, że NO produkowany jest również w komórkach ssaków i jest tożsamy z wcześniej odkrytym EDRF, który uznany został za niezbędny czynnik wazodylatacyjnego efektu działania acetylocholino (5). NO bierze udział w ośrodkowej i obwodowej regulacji ciśnienia tętniczego, działa inotropowo ujemnie, hamuje adhezję i agregację płytek krwi i leukocytów, blokuje patologiczną proliferację komórek śródbłonna, uczestniczy w autoregulacji przepływu krwi w różnych narządach (10). W ośrodkowym układzie nerwowym NO pełni funkcję atypowego neuroprzekaźnika i neuromodulatora, uczestniczy w przekazywaniu informacji wewnątrz komórek i pomiędzy nimi. Bierze udział w patogenezie wstrząsu septycznego, przewlekłych chorób neurodegeneracyjnych,

uszkodzenia mózgu w wyniku ischemii, w procesie angiogenezy i uszkodzeniu naczyń w przebiegu cukrzycy (4).

Istnieją również dowody na udział NO w fizjologii aparatu wzrokowego. I tak tlenek azotu uczestniczy w regulacji homeostazy gałki ocznej, w procesie wytwarzania cieczy wodnistej i regulacji ciśnienia śródgałkowego, w neurotransmisji siatkówkowej i fototransdukcji. W oku NO moduluje lokalny przepływ krwi, kontroluje apoptozę komórek zwojowych, stanowi istotne ogniwo patogenetyczne procesów zapalnych (*retinitis, uveitis*) oraz chorób neurodegeneracyjnych (jaskra, choroby zwyrodnieniowe siatkówki) (7,9,11).

Biosynteza NO

Gazowa natura NO i krótki okres jego półtrwania sprawiają, że produkowany *de novo* szybko dyfunduje on przez błony komórkowe, bezpośrednio oddziałuje na składniki wewnątrzkomórkowe i nie jest magazynowany w pęcherzykach synaptycznych. Dotychczas nie stwierdzono istnienia żadnych specyficznych dla tego przekaźnika receptorów błonowych. Odkrycie nieco odmiennej roli NO jako cząstki przekaźnikowej w OUN zmieniło radykalnie dotychczasowe pojmowanie neurotransmisji (tab. I). Ponieważ struktura i funkcja NO nieco odbiega od tradycyjnego pojmowania neuroprzekaźnictwa, zaliczany jest on obecnie do tzw. atypowych neuroprzekaźników (1).

NO wytwarzany jest stale w konstytucjonalnych ilościach w wyniku stereospecyficznej reakcji utleniania L-argininy do NO i L-cytruliny z udziałem enzymu – syntazy NO (NOS) w obecności tlenu i różnego typu kofaktorów (NADPH, Ca²⁺ kalmulina, BH₄) (8). Produkcja NO może być hamowana przez zastosowanie analogów L-argininy np. L-NAME, L-NMNA, które działają jako kompetycyjne inhibitory NOS. Dotychczas zidentyfikowano i sklonowano trzy formy NOS, a ich

Neuroprzeakaźnik Neurotransmitter	Atypowy neuroprzeakaźnik – NO Atypical neurotransmitter – NO
najczęściej: peptyd, polipeptyd, amina most frequently: peptide, polypeptide, amine	wolnorodnikowy, nieorganiczny gaz free radical, inorganic gas
syntetyzowany przez neuron presynaptyczny synthesized in presynaptic neuron	syntetyzowany „na żądanie” synthesized „on demand”
magazynowany w pęcherzykach synaptycznych stored in synaptic vesicles	nie jest magazynowany (bardzo krótki okres półtrwania) not stored (very short half-life)
uwalniany w momencie depolaryzacji released during depolarization	łatwo dyfunduje przez błony komórkowe na niewielkie odległości easily diffusible across cell membranes
oddziałuje na swoiste receptory postsynaptyczne acts via traditional receptors on postsynaptic membranes	bezpośrednio oddziałuje na składniki wewnątrzkomórkowe directly acts on intracellular components

Tab. I. Zestawienie cech tradycyjnego i atypowego neuroprzeakaźnika.
Tab. I. Comparison of the main features of traditional and atypical neurotransmitters.

nazwy pochodzą od nazw tkanek, w których po raz pierwszy zbadano ich obecność (tab. II).

Neuronalna NOS (nNOS, bNOS lub NOS-1) jest formą konstitutywną, występującą w neuronach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego oraz neuronach NANC (nieadrenergicznych, niecholinergicznych), w siatkówce, a także w mięśniach szkieletowych, neutrofilach, komórkach nabłonka jelitowego. Produkowany pod jej wpływem NO pełni funkcję atypowego przeakaźnika, reguluje funkcję ośrodka naczynioruchowego i pośredniczy w aktywacji receptorów jonotropowych NMDA. Endotelialna NOS (eNOS albo NOS-3) występuje głównie w komórkach śródbłonka, gdzie reguluje podstawowe napięcie mięśni gładkich naczyń. Jednak komórki endotelium to nie jedyne miejsce występowania eNOS. Zlokalizowano ją również w kardiomiocytach, osteoblastach, osteoklastach, trombocytach oraz komórkach mezangialnych nerki. Aktywność NOS-1 i NOS-3 zależna jest od Ca²⁺ i kalmoduliny, a ich aktywacja jest odpowiedzią na wzrost poziomu wapnia wewnątrz komórki.

Aktywacja trzeciej znanej izoformy enzymu – indukowanej syntazy NO (iNOS, NOS-2) następuje w odpowiedzi na czynniki zapalne i cytokiny (LPS, TNF- α , IL-1 β , INF- γ), które aktywują odpowiednie geny i inicjują syntezę mRNA prekursorowego dla iNOS. NOS-2 jest nieodłącznym ogniwem sprawczym procesów zapalnych i neurodegeneracyjnych (9). Po ekspozycji na cytokiny i na endotoksyny, makrofagi i neutrofile zaczynają produkować olbrzymie ilości NO, a proces ten trwa wiele godzin. Wchodząc w reakcję z jonami nadtlenkowymi (produkt metabolizmu mitochondrialnego), NO tworzy wysoce toksyczne jony peroksynitratów OONO⁻ i jony wodorotlenowe OH⁻, które uszkadzają sąsiednie komórki. iNOS jest głównym efektem funkcji cytotoksycznej makrofagów, a jej aktywność jest niezależna od Ca²⁺ kalmoduliny. Wzrost poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego w endotelium następuje na skutek

receptorowej aktywacji napływu jonów do komórki po pobudzeniu odpowiednich receptorów, m.in. przez acetylocholiny, histaminę, bradykininę, podczas gdy w neuronach wzrost poziomu wapnia może być rezultatem postsynaptycznej aktywacji receptorów NMDA, które należą do rodziny receptorów jonotropowych, związanych z kanałem wapniowym. Zestawienie podstawowych cech syntaz tlenu azotu zawiera tabela II.

Izoenzym / lokalizacja Isoenzyme / localization	Regulacja Regulation	Funkcja fizjologiczna Physiological function
Izoenzym typ I (nNOS, bNOS) [neurony ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, neurony NANC] Isoenzyme type I (nNOS, bNOS) [neurons of central and peripheral neural system, NANC neurons]	Aktywowany przez kompleks Ca ²⁺ /kalmodulina Activated by the calcium/calmodulin complex	– regulacja transmisji synaptycznej (pośrednictwo aktywacji NMDA) – regulation of synaptic transmission (NMDA activation) – ośrodkowa regulacja ciśnienia tętniczego – central regulation of blood pressure – relaksacja mięśni gładkich i wazodylatacja – smooth muscle relaxation and vasodilatation
Izoenzym typ III (eNOS) [endotelium, mezangium, płytki krwi, osteoblasty, osteoklasty] Isoenzyme type III (eNOS) [endothelium, mesangium, osteoblasts, osteoclasts]	Aktywowany przez kompleks Ca ²⁺ /kalmodulina Activated by the calcium/calmodulin complex	– hamowanie adhezji i agregacji płytek – antiadhesive, antiplatelet – wazodylatacja – vasodilatation – hamowanie proliferacji mięśniówki gładkiej – antiproliferative
Izoenzym typ II (iNOS) [makrofagi, neutrofile, fibroblasty] Isoenzyme type II (iNOS) [macrophages, neutrophils, fibroblasts]	Indukowana przez (LPS, TNF- α , IL-1 β , INF- γ) niezależna od kompleksu Ca ²⁺ /kalmodulina Inducible NOS (activated by LPS, TNF- α , IL-1 β , INF- γ)	– główny efektor funkcji cytotoksycznej makrofagów – main effector of cytotoxic function of macrophages

Tab. II. Zestawienie podstawowych cech syntaz tlenu azotu (NOS).
Tab. II. Juxtaposition of the main features of nitric oxide synthases (NOS).

Funkcje NO

Syntezę NO w powiązaniu z jego podstawowymi funkcjami zestawiono na rycinie 1.

W zależności od okoliczności syntezy i warunków aktywacji odpowiednich szlaków, prowadzących do powstania NO, może on pełnić różnorodne funkcje. W warunkach fizjologicznych NO odgrywa rolę neuroprzeakaźnika, prowadząc do modulacji aktyw-

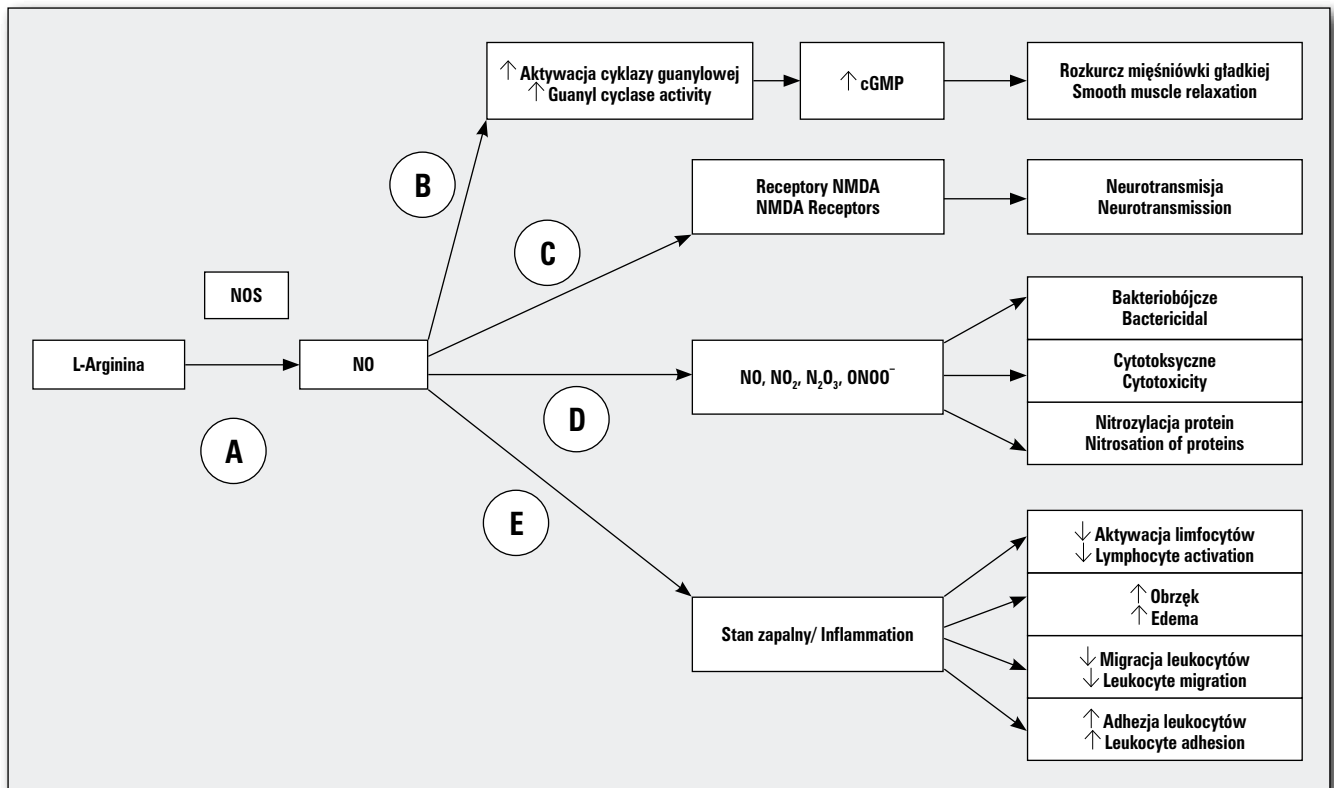
ności funkcji wewnątrzkomórkowych układów białkowych i enzymatycznych (2) (ryc. 2).

Istnieje wiele dowodów na udział NO w procesach neurocytotoksycznych (3). Aktywacja receptorów NMDA przez nadmiar glutaminy – głównego aminokwasu pobudzającego (np. w wyniku ischemii obserwowanej w przebiegu udaru niedokrwiennego mózgu) i związany z tą aktywacją wzrost Ca^{2+} wewnątrzkomórkowego powodują uaktywnienie NOS i uwalnianie dużych ilości NO (6). Tlenek azotu ma zdolność łączenia się z anionami nadtlenkowymi, w wyniku czego powstają wysoce toksyczne jony peroksyntratów. Podobne procesy zachodzą również w siatkówce i głowie nerwu wzrokowego. Tlenkowi azotu przypisuje się działanie neurotoksyczne (2), co ilustruje rycina 3.

Postuluje się udział przedstawionych na rycinie 3 mechanizmów w patogenezie i uszkodzeniu neuronów w przebiegu udaru niedokrwiennego mózgu, chorobie Parkinsona, chorobie Alzheimera, padaczkę, demencji w przebiegu AIDS (12). Te same mechanizmy mają również ogromne znaczenie dla funkcjonowania narządu wzroku. Uszkodzenie komórek zwojowych siatkówki, wywołane wzmoczoną aktywnością aminokwasów pobudzających, głównie

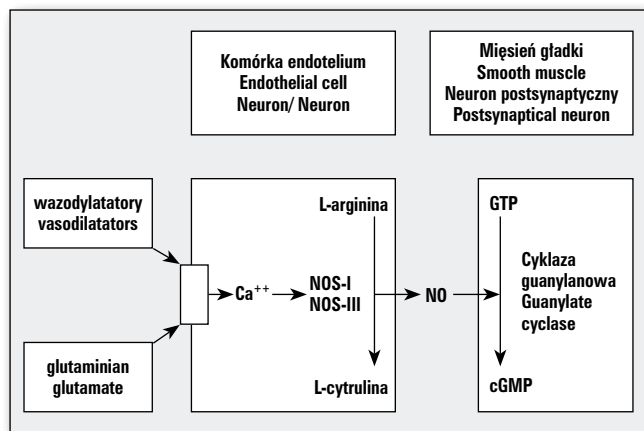
glutaminianu, wykazano w patogenezie jaskry, przedniej neuropatii niedokrwiennej n. II, niedokrwieniu siatkówki przy zatorze tętnicy środkowej siatkówki oraz neuropatii w przebiegu AIDS czy procesie angiogenezy w przebiegu retinopatii cukrzycowej (11).

Szczegółowa znajomość znaczenia tych substancji dla patomechanizmu uszkodzenia poszczególnych struktur gałki ocznej może być pomocna w dążeniu do ochrony tych tkanek w przebiegu wielu chorób oczu. W trakcie pionierskich badań, dotyczących funkcji NO w tkankach oka, uwaga naukowców skupiona została na jego roli w regulacji miejscowego przepływu krwi, procesach immunologicznych, udziale w neurotransmisji i fizjologii siatkówki. Złożoność mechanizmów, w których uczestniczy tlenek azotu, sprawia, że trudno jest jednoznacznie ocenić jego rolę. Niewątpliwie jego nadmiar jest toksyczny, dlatego też inhibitory NOS stanowią obecnie eksperymentalną grupę leków o potencjale leczniczym w chorobach zapalnych, zwyrodnieniowych i neurodegeneracyjnych. Istnieją również dowody na korzystny udział tlenku azotu w regulacji miejscowego przepływu krwi i obniżaniu ciśnienia gałkowego. Podawanie nietoksycznych donorów NO może przyczynić się do normali-



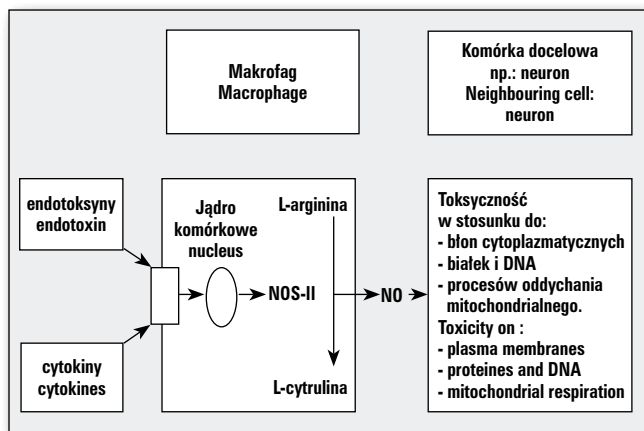
Ryc. 1. Synteza i podstawowe funkcje tlenku azotu (NO) – według R.A. Robbinsa, M.B. Grishama (10). A – synteza NO z L-argininy z udziałem NOS. B – NO aktywuje cyklazę guanylową, prowadząc do wzrostu cyklicznego GMP, który powoduje relaksację mięśni gładkich naczyń krwionośnych i spadek ciśnienia tętniczego. C – NO funkcjonuje jako neurotransmitter, stymulując receptory NMDA. D – NO i jego tlenki wywołują efekty bakteriobójcze lub cytotoksyczne. Dodatkowo związki te mogą prowadzić do nitrozylacji protein, zmieniając ich funkcję. E – NO moduluje przebieg procesu zapalnego przez nasilenie zjawisk przeciwzapalnych (hamowanie aktywacji limfocytów) oraz efekt prozapalny: wzrost migracji i adhezji leukocytów (10).

Fig. 1. Overview of the formation and some of the function of nitric oxide (NO) – modification after R.A. Robbins, M.B. Grisham (10). A – the NO is formed by cleavage of arginine by the enzyme NO synthase (NOS). B – NO can stimulate guanylyl cyclase leading to increased formation of cyclic GMP, which in turn relaxes smooth muscle, such as vascular smooth muscle, producing a decrease in blood pressure. C – NO can act as a neurotransmitter by stimulating NMDA receptors. D – the NO and/or its oxides (such as NO₂, N₂O₃, and ONOO⁻) can produce bactericidal or cytotoxic effects. In addition, NO and/or its oxides can nitrosate proteins or thiols altering protein function. E – NO can modulate inflammation, producing both anti-inflammatory effects, such as a decrease in lymphocyte activation, or pro-inflammatory effects, such as increase in leukocyte migration (10).



Ryc. 2. NO jako neuronalna cząstka przekaźnikowa (według F. Becqueta – zmodyfikowane i uzupełnione).

Fig. 2. NO as a neuronal messenger molecule (modification after F. Becquet).



Ryc. 3. NO jako cząstka neurotoksyczna (według F. Becqueta – zmodyfikowane i uzupełnione).

Fig. 3. NO as a neurotoxic molecule (modification after F. Becquet).

zacji ciśnienia śródgałkowego i stanowić nowy kierunek terapii. Niewątpliwie ścieżki metaboliczne, w które uwikłany jest NO, są bardzo istotne w procesie poszukiwania nowych metod terapeutycznych.

PIŚMIENNICTWO:

1. Baranoano D.E., Ferris C.D., Snyder S.H.: *Atypical neural messengers*. *Trends Neurosci.*, 2001, Vol. 24, No. 2, 99-106.
2. Becquet F., Courtois Y., Goureau O.: *Nitric oxide in the eye: Multifaceted roles and diverse outcomes*. *Serv. Ophthalmol.*, 1997, Vol. 42(1), 71-82.
3. Dawson V.L., Dawson T.M.: *Nitric oxide action in neurochemistry*. *Neurochem. Int.*, 1996, Vol. 29, No. 2, 97-110.
4. El-Asrar A.M., Desmet S., Meersschaert A., Dralands L., Misset S., Geboes K.: *Expression of iducible isoform of nitric oxide in the retinas of human subjects with diabetes mellitus*. *Am. J. Ophthalmol.*, 2001, Vol. 132, No. 4, 551-556.
5. Furchgott R.F., Zawadzki J.V.: *The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980, 288, 373-376.
6. Garthwaite J., Carles S.L., Chess-Williams R.: *Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor*

suggests a role as a intracellular messenger in brain. *Nature*, 1988, 336, 385-388.

7. Haefliger I.O., Dettmann E., Liu R., Meyer P., Prunte Ch., Messerli J., Flammer J.: *Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma*. *Serv. Ophthalmol.*, 1999, Vol. 43, Suppl. 1, S51-S58.
8. Moncada S.: *The L-Arginine: nitric oxide pathway*. *Acta Physiol. Scand.*, 1992, 145, 201-227.
9. Neufeld A.H.: *Nitric oxide: A potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma*. *Serv. Ophthalmol.*, 1999, Vol. 43, Suppl. 1, S 129-S 135.
10. Robbins R.A., Grisham M.B.: *Molecules in focus. Nitric oxide*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 1997, Vol. 29, No. 6, 857-860.
11. Sucher N.J., Lipton S.A., Drayer E.B.: *Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells*. *Vision Res.*, 1997, Vol. 37, No. 24, 3483-3493.
12. Vorwerk C.K., Gorla M.S., Dreyer E.B.: *An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy*. *Serv. Ophthalmol.*, 1999, Vol. 43, Suppl. 1, S 142-S 150.

Praca wpłynęła do Redakcji 4.10.2004 r. (643).
Zakwalifikowano do druku 18.01.2006 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
lek. med. Katarzyna Komaszyło
Klinika Okulistyki AMB
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a
15-276 Białystok