

Maciej Stępnik

**MOLEKULARNE ASPEKTY TOKSYCZNEGO DZIAŁANIA TLENKU AZOTU**

## MOLECULAR ASPECTS OF TOXIC EFFECTS OF NITRIC OXIDE

Z Zakładu Toksykologii i Kancerogenezy

Instytutu Medycyny Pracy im. J. Nofera w Łodzi

Kierownik zakładu: dr hab. W. Wąsowicz

**STRESZCZENIE** Chociaż tlenek azotu (NO) bierze udział w wielu procesach fizjologicznych organizmu, jego właściwości fizykochemiczne sprawiają, iż może on być w pewnych warunkach niebezpieczny dla żywych komórek. Narażenie organizmu na NO może mieć charakter endogenny (np. nadmierna produkcja przez aktywowane komórki zapalne) lub egzogeny (głównie drogą inhalacyjną). W tej pracy przedstawiono, obok krótkiego przeglądu potencjalnych źródeł narażenia na tlenek azotu, także niektóre molekularne aspekty jego działania toksycznego: działanie prooksydacyjne, genotoksyczne i mutagenne, wpływ na cykl podziału komórkowego jak również hamujący wpływ na syntazy tlenku azotu na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Med. Pr. 2001; 52; 5; 375—381

**SŁOWA KLUCZOWE:** tlenek azotu, działanie prooksydacyjne, genotoksyczność, mutagenność, cykl komórkowy, syntazy

**ABSTRACT** Although Nitric oxide (NO) is involved in many physiological processes of the body, its physico-chemical properties may, under some conditions, become dangerous to living cells. NO exposure may be of endogenous (e.g. local overproduction by activated inflammatory cells) or exogenous origin (mainly by inhalation route). Together with a short review of potential sources of NO exposure, the author presents some molecular aspects of its toxic effects: prooxidant effect, genotoxicity and mutagenicity, impact on the cell cycle and feedback inhibitory effect on NO synthase. Med Pr 2001; 52; 5; 375—381

**KEY WORDS:** nitric oxide, prooxidant effect, genotoxicity, mutagenicity, cell cycle, synthase

Tlenek azotu (NO) odgrywa ważną rolę jako cząsteczka sygnałowa w regulacji wielu procesów życiowych, jak również jako cytotoksyczna cząsteczka efektorowa niespecyficznego odpowiadzi immunologicznej. Choć posiada on bardzo ważne znaczenie fizjologiczne, jego właściwości fizykochemiczne sprawiają, iż nadmierna ekspozycja żywych komórek na jego duże stężenia prowadzi do różnorodnych efektów szkodliwych. Źródło narażenia organizmu na NO może mieć charakter egzogeny (droga inhalacyjna) lub endogeny (np. miejscowa nadmierna produkcja w obszarze ogniska zapalnego). Endogeny tlenek azotu wytwarzany jest przez enzymy syntazy tlenku azotu w drodze utleniania L-argininy:

$$\text{L-Arginina} + \text{NADPH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{L-Cytrulina} + \text{Tlenek azotu} + \text{NADP}^+$$

Do tej pory zidentyfikowano dwie podstawowe formy syntaz NO: konstytucjonalną cNOS (tu wyróżnia się formy: neuronalną (nNOS) i śródbłonkową (eNOS), obie zależne od wapnia) i indukowalną (iNOS, niezależną od wapnia) (1). Główne różnice pomiędzy aktywnościami cNOS i iNOS nie polegają na ilościach NO wytwarzanych przez dany enzym, ale raczej na czasie trwania produkcji NO. Właściwości przekaźnikowe polegają na uwalnianiu tlenku azotu w krótkich (sekundy, minuty), kontrolowanych ilościach (aktywność cNOS), podczas gdy właściwości cytotoksyczne ujawniają się w warunkach długotrwałej (godziny, dni) jego produkcji (aktywność iNOS).

**ŹRÓDŁA NARAŻENIA NA EGZOGENNY TLENEK AZOTU**

W związkach chemicznych azot może występować na siedmiu stopniach utlenienia -3 (NH<sub>3</sub>), -1, +1, +2, +3, +4 i +5.

Daje to możliwość występowania w powietrzu atmosferycznym kilku różnych tlenków azotu: podtlenku azotu (N<sub>2</sub>O), tlenku azotu (NO), trójtlenku dwuazotu (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), dwutlenku azotu (NO<sub>2</sub>), czterotlenku dwuazotu (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), trójtlenku azotu (NO<sub>3</sub>), pięcioletku dwuazotu (N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Spośród tych związków NO, NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> są wolnymi rodnikami. W powietrzu w największych ilościach występują NO i NO<sub>2</sub>, a narażenie inhalacyjne na nie stanowi obecnie jedno z najważniejszych zagrożeń zdrowotnych dla człowieka zarówno w środowisku zawodowym, jak i bytowania. Zazwyczaj ekspozycję na tlenki azotu uważa się za ekspozycję mieszaną ze względu na spontaniczną reakcję NO z tlenem powietrza i wytwarzanie NO<sub>2</sub> (2NO + O<sub>2</sub> → 2NO<sub>2</sub>). Wartość stałej szybkości tworzenia NO<sub>2</sub> oszacowano na ok. (1,2 ± 0,1) × 10<sup>11</sup> ppm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> (2). Mieszaninę NO i NO<sub>2</sub> często określa się jako NO<sub>x</sub>.

U ludzi w układzie oddechowym około 80-90% ilości tlenku azotu ulega absorpcji do krwi, głównie w formie niezmienionej (3). Badania *in vitro* wykazały wzrost powinowactwa do hemoglobiny kolejno dla tlenu, tlenku węgla i tlenku azotu. *In vitro* NO w reakcji z hemoglobiną tworzy nitrozohemoglobinę (NOHb) w nieobecności tlenu i methemoglobinę (MetHb) w obecności tlenu. NOHb ulega utlenieniu do MetHb w obecności tlenu. W surowicy zdrowych ochotników NO ulega przekształceniu do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup> w stosunku ilościowym 5:1.

Głównymi przemysłowymi źródłami narażenia na NO są m.in. procesy technologiczne związane z produkcją kwasu azotowego, nawozów azotowych, materiałów wybuchowych, jak również związane z procesami spawania łukowego i gazowego oraz trawienia metali. Szczególnym źródłem narażenia na NO są silosy do przechowywania produktów

rolniczych, w których chwilowe stężenia NO mogą osiągać wyjątkowo wysokie wartości.

Głównym źródłem narażenia na NO w środowisku zewnętrznym w rejonach miejskich stanowi ruch komunikacyjny (z charakterystycznym zwiększaniem się stężeń podczas godzin rannych i popołudniowych) oraz spalanie materiałów opałowych (NO stanowi ok. 85–95% NO<sub>x</sub> powstających w normalnym procesie spalania). W środowisku mieszkalnym najważniejszym źródłem narażenia na NO<sub>x</sub> są otwarte palniki gazowe (maksymalne stężenia 1-godzinne NO<sub>2</sub> mierzone 1 metr od palnika wynosiły 230–2055 µg/m<sup>3</sup>, a 1-minutowe 400–3808 µg/m<sup>3</sup> (3)). Palenie tytoniu również może stanowić ogromne źródło ekspozycji na tlenek azotu. Stężenia tego związku w dymie tytoniowym osiągają wartości 100–1350 mg/m<sup>3</sup> (4).

W ostatnich latach tlenek azotu znajduje coraz większe zastosowanie terapeutyczne u pacjentów ze zmianami chorobowymi układu krwionośnego płuc. Noworodki z niewydolnością układu oddechowego związaną z przetrwałym nadciśnieniem płucnym, wydają się odnosić największe korzyści z takiej terapii. Obserwowano u nich polepszenie parametrów natlenowania krwi, zmniejszenie potrzeby stosowania natleniania pozaustrojowego (Extracorporeal Membrane Oxygenation; ECMO) oraz spadek śmiertelności (5). Większość współczesnych zaleceń sugeruje kliniczne stosowanie stężeń nieprzekraczających 50 mg/m<sup>3</sup>. Choć w takich warunkach tlenek azotu wykazuje niewielką toksyczność krótkoterminową, wydaje się jednak, na podstawie obszernej literatury na temat jego właściwości biologicznych i chemicznych w różnych układach doświadczalnych, iż niektóre efekty niepożądane tego związku po narażeniu inhalacyjnym są nieuniknione.

## PODSTAWOWE MECHANIZMY MOLEKULARNE DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO TLENKU AZOTU

### Działanie pro- i antyoksydacyjne

Od czasów odkrycia właściwości tlenku azotu, jako cząsteczki przekazującej informację, jego udziału dowiedziono w wielu procesach biologicznych, włączając w to np. rozszerzanie układu naczyniowego i oskrzelowego, neuroprzekaznictwo, hamowanie działania fagocytów i agregacji płytek, czy też działanie bakteriobójcze (6,7,8). Nasiloną produkcją endogennego tlenku azotu podczas procesów immunologiczno-zapalnych układu oddechowego stanowi mechanizm obronny gospodarza przeciw różnym patogenom. Choć takie działanie jest niewątpliwie pożądane, może stanowić jednak dość poważne niebezpieczeństwo. Badania na myszach transgenicznym, pozbawionych formy indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) i w ten sposób możliwości endogennego wytwarzania NO, wykazywały mniejszą śmiertelność w przebiegu zapalenia płuc w następstwie zakażenia wirusem grypy, jak również były mniej wrażliwe od myszy kontrolnych na uszkodzenie płuc po iniekcji endotoksyny (9). Badania te wskazują, iż

nadmierna produkcja endogennego NO podczas chorób zapalnych układu oddechowego może być dodatkową przyczyną uszkodzenia tego układu.

Również narażenie na egzogeny NO stanowi poważne zagrożenie zdrowotne. Jak się wydaje, bardzo czułym parametrem działania toksycznego tego związku jest spadek odporności eksponowanego organizmu na infekcje. Efekt taki obserwowano u myszy narażonych na aerozol bakteryjny po uprzedniej ekspozycji na NO w stężeniu 2 ppm (10). Również Holt (11) wykazał, iż ekspozycja inhalacyjna myszy na NO (10 ppm, 2 h/dzień przez 30 tygodni) wywołuje zahamowanie czynności układu immunologicznego oraz zmniejszenie zdolności do odrzucania nowotworów indukowanych wirusami.

Większość efektów biologicznych oddziaływania NO z białkami komórkowymi zależy od (12):

- interakcji z paramagnetycznymi centrami efektorowymi białek, do których należą m.in. zawierające ugrupowania hemowe: cykloaza adenylanowa, hemoglobina i oksydaza cytochromowa c,

- interakcji z ugrupowaniami sulfhydrylowymi (–SH) na drodze S-nitrozowania,

- uwalniania przez niego Fe<sup>2+</sup> z komórek i niszczenia wiązań Fe-S w enzymach (np. akonitazie biorącej udział w cyklu kwasu cytrynowego czy ferrochelatazie katalizującej wbudowywanie jonu Fe<sup>2+</sup> do protoporfiryny),

- oddziaływania z białkami zawierającymi tzw. palce cynkowe, czyli specyficzne struktury umożliwiające wiązanie się białek z odpowiednimi sekwencjami DNA czy RNA. Białka zawierające palce cynkowe biorą udział m.in. w procesach transkrypcji, replikacji, czy rekombinacji. Wykazano, iż NO uwalnia *in vitro* Zn<sup>2+</sup> z metalotioneiny wiążącej cynk, hamuje wiązanie się czynników transkrypcyjnych LAC9 i NF-κB z DNA, hamuje aktywność kinazy białkowej C (również zawierającej palec cynkowy w domenie regulatorowej) i enzymu Fpg, biorącego udział w procesie naprawy DNA.

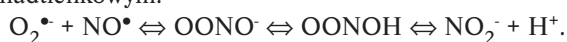
Nieprawidłowe produkty nitrozowania białek błonowych komórek mogą być przyczyną zaburzeń czynności recep-

**Tabela I.** Reaktywne formy azotu o właściwościach biologicznych (15)

Wzór	Nazwa	Stopień utlenienia
NO <sup>-</sup>	Anion nitroksylowy	+1
N <sub>2</sub> O	Podtlenek azotu	+1
NO <sup>·</sup>	Tlenek azotu	+2
NO <sup>+</sup>	Kation nitrozylowy	+3
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Azotyn	+3
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trójtlenek dwuazotu	+3
NO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Dwutlenek azotu	+4
N <sub>2</sub> O <sup>4</sup>	Czterotlenek dwuazotu	+4
ONOO <sup>·</sup>	Nadtlenoazotyn	+5
NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Kation nitrylowy (nitroniowy)	+5
NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Azotan	+5

torów powierzchniowych komórek (13) oraz aktywności kanałów jonowych (14). S-nitrozotiole w białkach (albuminy) lub w niskocząsteczkowych tiolach (glutation), powstające w następstwie inhalacji tlenków azotu wykryto w układzie krążenia, jak również w płynie pokrywającym powierzchnię układu oddechowego (7).

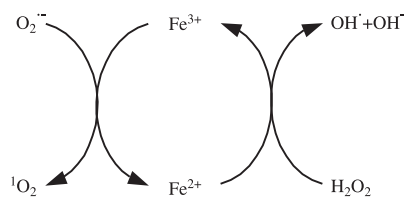
Ostatecznymi produktami metabolizmu tlenu azotu są azotyny ( $\text{NO}_2^-$ ) i azotany ( $\text{NO}_3^-$ ), związki szybko rozmieszczane w organizmie i wydalone z moczem. Metabolizm NO obejmuje tworzenie wielu pośrednich produktów o dużej reaktywności, w których azot występuje na kilku różnych stopniach utlenienia od +1 do +5 (tabela I). Bardzo duże znaczenie w mechanizmach toksycznego oddziaływania tlenu azotu przypisuje się nadtlenuazotynowi będącemu produktem jego reakcji z rodnikooanionem ponadtlenkowym:



Powstający nadtlenuazotyn jak i kwas nadtlenuazotawy są silnymi czynnikami utleniającymi i wykazują właściwości bakteriodobójcze i cytotoksyczne. Nadtlenuazotyn inicjuje procesy peroksydacji lipidów i oksydacji tioli z wydajnością przynajmniej 1000-krotnie większą niżeli  $\text{H}_2\text{O}_2$ , jak również zaburza mitochondrialny łańcuch transportu elektronów (16). Dodatkowo, nitruje on ugrupowania fenolowe, m.in. tyrozyny i tryptofanu w niektórych białkach, co może zaburzać wewnątrzkomórkowe procesy transdukcji sygnału (17). Aminokwas tyrozyna wydaje się szczególnie wrażliwy na nitrowanie, a zjawisko tworzenia wolnej lub związanej z białkami 3-nitrotyrozyny w ostatnich latach cieszy się dużym zainteresowaniem jako potencjalny marker tworzenia reaktywnych form azotu *in vivo*. Poprzez reakcję z rodnikooanionem ponadtlenkowym, tlenek azotu efektywnie konkuruje z dysmutazą nadtlenkową (SOD), która, jak wiadomo, katalizuje reakcję dysmutacji rodnikooanionu ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru. Ponieważ SOD obecna jest wewnątrzkomórkowo we względnie wysokich stężeniach mikromolowych, tworzenie nadtlenuazotynu promowane jest w warunkach nadprodukcji NO lub też  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , co ma miejsce w obszarze aktywnie toczącego się ogniska zapalnego.

Oprócz badań wskazujących na potencjalne działanie uszkodzające NO wytwarzanego w nadmiarze, istnieją prace wykazujące jego działanie ochronne w warunkach stresu oksydacyjnego. Ostateczna odpowiedź w tkance zależy najprawdopodobniej od ilości obecnego NO oraz obecności innych reaktywnych form cząsteczkowych. Ogólnie biorąc, właściwości antyoksydacyjne NO dominują w warunkach jego małego stężenia lub krótkotrwałego oddziaływania.

Tlenek azotu hamuje proces peroksydacji lipidów przez układ związku żelaza/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , przez reaktywne formy tlenu lub związku azowe (12). Hamuje on również peroksydację lipidów lipoprotein małej gęstości (LDL) przez aktywowane makrofagi lub katalizowaną przez jony  $\text{Cu}^{2+}$ . Niskie stężenia NO chronią komórki przed krótkoterminowym działaniem  $\text{H}_2\text{O}_2$  lub nadtlenków alkilowych. Powyższe właściwości wydają się uzależnione m.in. od „wymiatania” silnie



Ryc. 1. Działanie jonów żelaza w reakcji Habera-Weissa.

reaktywnych form tlenu. Reagując z rodnikooanionem ponadtlenkowym NO może efektywnie konkurować z jonami  $\text{Fe}^{3+}$  i zmniejszać wytwarzanie rodników hydroksylowych na drodze reakcji Habera-Weissa (ryc. 1).

Tlenek azotu bezpośrednio reguluje zużycie tlenu i fosforylację oksydacyjną w mitochondriach poprzez odwracalne hamowanie oksydazy cytochromowej (18). Dodatkowo, niskie stężenia NO mogą działać antyoksydacyjnie poprzez zwiększanie stężeń wewnątrzkomórkowego zredukowanego glutationu (19).

## DZIAŁANIE GENOTOKSYCZNE I MUTAGENNE

Badania ostatnich dziesięciu lat wskazują na tlenek azotu jako na potencjalny czynnik genotoksyczny i mutageny. Obserwowano, iż NO prowadzi do deaminacji zasad nukleotydowych i DNA izolowanego z cielęcej grasicy (przekształcanie ugrupowań cytozyny, 5-metylocytozyny, guaniny i adeniny, odpowiednio do alternatywnych zasad: uracylu, tyminy, ksantyny i hipoksantyny) (20), wywołuje efekt mutageny w testach *in vitro* z użyciem *Salmonella typhimurium* (21), izolowanego DNA plazmidu pSP189 (22) i ludzkich komórek limfoblastycznych TK6 (23) oraz *in vivo* w tkance płucnej szczura (24).

Uważa się, że uszkodzenie DNA może powstawać w wyniku reakcji produktów autooksydacji NO z niskocząsteczkowymi aminami lub amidami i wytwarzania związków N-nitrozowych alkilujących zasady DNA (25). Na przykład, nitrozowanie dimetyloaminy prowadzi do powstania silnego kancerogenu, N-nitrozodimetyloaminy, która po aktywacji metabolicznej przekształca guaninę do  $O^6$ -metyloguaniny. Ta z kolei, parując się preferencyjnie z tyminą podczas replikacji DNA powoduje tranzycję G:C→A:T w komórkach potomnych, co uważa się za ważny etap w inicjacji procesu kancerogenezy.

Działanie prokancerogenne tlenu azotu może wynikać również z zaburzenia czynności enzymów (S-nitrozowanie) odpowiedzialnych za naprawę uszkodzonego DNA, np.  $O^6$ -alkiloguanino DNA-alkilotransferazy przekształcającej ugrupowania  $O^6$ -alkiloguaniny do guaniny, glikozylazy naprawiającej uszkodzenia polegające na oksydacyjnym otwarciu pierścienia purynowego do formamidopirymidynowego, czy też ligazy usuwającej pęknięcia pojedynczych nici DNA (26,27).

Wykazano iż, tlenek azotu oraz nadtlenuazotyn mogą indukować pęknięcia nici DNA. Pęknięcia pojedynczych nici (rozcinięcie przy każdym nukleotydzie, z niewielką tylko

preferencją dla guaniny) obserwowano w komórkach nie-naruszonych, poddanych działaniu nadtlenuazotynu, co świadczy o tym, iż związek ten może przenikać przez błonę do wnętrza komórki i indukować zmiany genetyczne (28). Wydaje się, że mechanizm rozcinania nici DNA pod wpływem NO w pierwszym etapie polega na tworzeniu miejsc pozbawionych zasad, co z kolei prowadzi do pęknięć nici pojedynczych i następnie podwójnych. W przypadku nadtlenuazotynu mamy do czynienia raczej z bezpośrednim cięciem wiązań cukier/fosforan (25). Istnieją dowody świadczące, iż indukowane nadtlenuazotynem pęknięcia nici prowadzą do aktywacji syntetazy poli(ADP)rybozowej (PARS) zwanej również polimerazą poli(ADP)rybozową. Enzym ten wykorzystuje dinukleotyd nikotynoamidoadeniny (formę utlenioną),  $\text{NAD}^+$ , jako substrat do przenoszenia adduktów poli(ADP)rybozy na różne jądrowe białka akceptorowe, jak histony H1, topoizomery I i II, polimerazy DNA i ligazy. Konsekwencją masywnej ADP-rybozylacji białek jądrowych jest wyczerpanie potencjału energetycznego komórki ( $\text{NAD}^+$  i ATP) oraz jej nieodwracalne uszkodzenie (29).

Tlenek azotu wykazuje wielostronne oddziaływanie na gen i białko p53. W komórkach ssaków eksponowanych na NO obserwowano stymulację ekspresji genu p53 (30). Z drugiej strony wiadomo, iż produkt tego genu może hamować ekspresję iNOS (31). Wskazuje to na istnienie ujemnego sprzężenia zwrotnego pomiędzy tymi dwoma genami. Poprzez akumulację białka p53 w komórce, NO może prowadzić do indukcji procesu apoptozy (32). Stwierdzono, że NO wywołuje zmiany konformacji białka p53, jak również znacząco zmniejsza jego specyficzne wiązanie z DNA (33). Nadmiar endogennego NO może indukować mutacje genu p53 polegające głównie na transwersjach G:C→T:A (34).

Wiele uwagi poświęcono rodzajowi mutacji powstających pod wpływem ekspozycji na NO, ale ponieważ jak do tej pory, komórki ssaków okazały się mniej wrażliwe niż komórki prokariotyczne na działanie genotoksyczne NO, uzyskane wyniki nie dają jednoznacznego poglądu w tej sprawie. Badania, w których plazmid zawierający gen o znanej sekwencji (*supF*) poddawano działaniu NO *in vitro* i następnie umieszczano w komórkach ludzkich lub bakteryjnych dla naprawy i replikacji wykazały istnienie przynajmniej trzech różnych spektrów mutacji: tranzykcje G:C→A:T w roztworze wodnym NO w obecności tlenu (35); transwersje G:C→T:A po ekspozycji na nadtlenuazotyn (36); oraz tranzykcje A:T→G:C po ekspozycji roztworu plazmidu na mieszaninę gazowego NO i  $\text{O}_2$  (37).

Coraz więcej danych sugeruje, że NO po ekspozycji inhalacyjnej może wywierać ogólnoustrojowe efekty toksyczne, włączając w to efekty genotoksyczne. Tlenek azotu związany z albuminą (S-nitroalbumina) posiada aktywność biologiczną i wykazano, że powoduje rozszerzenie naczyń tętniczych, żylnych jak również wieńcowych (38). NO może także wiązać się z wolnymi grupami hemowymi

hemoglobiny i nitrozylować tione bez utraty swej aktywności (39). Z powyższych danych wynika, iż albumina i hemoglobina może niejako transportować NO w aktywnej formie w obrębie układu krążenia. W zgodzie z tymi danymi są obserwacje Yadav i Seth (40), którzy badając efekty genotoksyczne narażenia na  $\text{NO}_x$  (średnie stężenie  $1770,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) w limfocytach krwi obwodowej u jubilerów trawiących złoto mieszaniną królewską wykazali m.in. zwiększenie indeksu mitotycznego, nasilenie częstości aberracji chromosomowych oraz wymian chromatyd siostrzanych w porównaniu z wartościami kontrolnymi. Badanie to stanowi pewien dowód na działanie genotoksyczne  $\text{NO}_x$  u ludzi.

## WPŁYW TLENKU AZOTU NA PROLIFERACJĘ

Tlenek azotu wykazuje działanie antyproliferacyjne wobec komórek na drodze mechanizmów cGMP-zależnych i cGMP-niezależnych. W warunkach fizjologicznych NO zwiększa aktywność wewnątrzkomórkowej rozpuszczalnej cykazy guanylanowej, co prowadzi do tworzenia cyklicznego GMP, odgrywającego rolę drugiego przekaźnika. Regulacja procesów komórkowych przez cGMP odbywa się dzięki jego interakcji ze specyficzną klasą białek zwanych kinazami zależnymi od cGMP lub kinazami G. Ważne znaczenie tych białek w hamowaniu proliferacji komórek przez NO wykazano np. w przypadku komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (41). Wyniki badań wskazują na hamowanie przez tlenek azotu aktywności tzw. kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK). Jest to prawdopodobnie uzależnione od fosforylowania przez kinazy-G białek Raf, które znajdują się wcześniej w ciągu transdukcji sygnału, pośrednicząc pomiędzy kinazami związanymi z receptorami błonowymi dla czynników wzrostu (np. naskórkowy czynnik wzrostu EGF) a kaskadą kinazy MAPK.

Do poznanych mechanizmów antyproliferacyjnego działania NO na drodze cGMP-niezależnej należy hamowanie aktywności kinazy zależnej od cyklin Cdk2 i transkrypcji genu cykliny A (42). Kinaza Cdk2 w kompleksie z cykliną E reguluje progresję cyklu komórkowego z fazy G1 do fazy S (syntezy DNA) poprzez fosforylację białka Rb (retinoblastoma) i uwolnienie czynnika transkrypcyjnego E2F. Cyklina A łączy się dwiema kinazami, Cdk2 i Cdc2 (lub Cdk1). Przyjmuje się, że aktywność kompleksu cykliny A/Cdk2 jest niezbędna dla progresji fazy S, podczas gdy kompleks cykliny A/Cdc2 dla progresji G2→M (43). Innymi mechanizmami antyproliferacyjnego działania NO na drodze cGMP-niezależnej są: aktywowanie białka p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (32, 44), które wiążąc się bezpośrednio z kompleksami cykliny E/Cdk2, cykliny D/Cdk4 i cykliny A/Cdk2 hamuje ich aktywność kinazową oraz hamowanie aktywności reduktazy rybonukleotydowej, enzymu odgrywającego rolę w syntezie DNA (45).

## DANE WSKAZUJĄCE NA DZIAŁANIE HAMUJĄCE EGZOGENNEGO NO I JEGO DONATORÓW NA SYNTAZY TLENU AZOTU

Badania *in vitro* z wykorzystaniem egzogennej NO lub jego donatorów dowodzą istnienia zwrotnego hamowania przez NO indukowalnej formy syntazy tlenu azotu (iNOS), enzymu odgrywającego bardzo ważną rolę w nieswoistej odpowiedzi obronnej makrofagów i limfocytów NK (Natural Killer) przeciw obcym komórkom nowotworowym, bakteryjnym i pasożytom (1,46). W związku z tym nie wykluczone jest, iż osłabienie parametrów czynnościowych komórek ekspozowanych na NO może osłabiać zdolności obronne organizmu wobec rozwijających się komórek nowotworowych.

Do tej pory istnieje niewiele danych dokumentujących hamujący wpływ egzogennej NO na aktywność obu form syntaz. Wśród tych danych dominują wyniki badań *in vitro*, gdzie efekt taki obserwowany był zarówno w odniesieniu do formy indukowalnej NOS zawartej w: komórkach makrofagów linii NR8383 (47); J774 (48); ANA-1 (49); RAW264.7 (50); w komórkach mikrogleju (51), jak i formy konstytucyjnej NOS: oczyszczonej nNOS ze szczurzego mózdzku (52); pochodzącej z nieoczyszczonego preparatu szczurzego mózdzku (53); komórek śródbłonna tętnicy płucnej owcy (54) i aorty wołu (55).

Wykonane do tej pory badania *in vivo* są badaniami krótkoterminowymi, zaś uzyskane wyniki nie są jednoznaczne. Wyraźne zahamowanie aktywności NOS w płucach owiec po 6 godzinach inhalacji NO (40 ppm) obserwowali Black i in. (56). Aktywność enzymu po jednej godzinie od przerwania narażenia wynosiła ok. 70% aktywności wyjściowej. Brady i in. po narażeniu szczurów na NO (6 ppm/1h, 1 dz., 1 tydz.) obserwowali w płucach wzrost ekspresji iNOS po godzinie, która jednak już po dobie powróciła do wartości kontrolnych (57). Podobny efekt zwiększenia wytwarzania NO i ekspresji iNOS mRNA w makrofagach pęcherzykowych u myszy krótkotrwale narażonych inhalacyjnie na NO (20-100 ppm, 5 h) obserwowali Weinberger i in. (58).

Niektóre badania *in vitro* wskazują na dwufazowość wpływu egzogennej NO na syntazę. Jego niskie stężenia mogą nasilać ekspresję iNOS mRNA w makrofagach stymulowanych IFN-gamma i LPS, podczas gdy wysokie stężenia hamują tę ekspresję (49). Prawdopodobnym mechanizmem hamowania NOS przez NO może być tworzenie połączenia nitrozowego z hemem syntazy (59). Zaproponowano również, iż NO indukuje aktywność oksydazy NADPH-zależnej. Prowadzi to do zwiększenia stężenia wewnątrzkomórkowego anionu nadtlenu reagującego z NO z wytworzeniem nadtlenu azotu bezpośrednio nitrozylicznego krytyczne ugrupowania aminokwasowe eNOS (54).

## PIŚMIENNICTWO

1. Nathan C., Xie Q.: Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994, 78, 915-918.
2. Sokol G., Van Meurs K., Wright L.L.: Nitrogen dioxide formation during inhaled nitric oxide therapy. *Clin. Chem.* 1999, 45, 382-387.
3. Berglund M.: Health risk evaluation of nitrogen oxides. *Exposure. Scand. J. Work Environ. Health* 1993, 19, 14-20.
4. Chambers D.C., Tunnicliffe W.S., Ayers J.G.: Acute inhalation of cigarette smoke increases lower respiratory tract nitric oxide concentrations. *Thorax* 1998, 53, 677-679.
5. Finer N., Barrington K.: Nitric oxide therapy for the newborn infant. *Semin. Perinatol.* 2000, 24, 59-65.
6. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991, 43, 109-142.
7. 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.
8. Fang F.C.: Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* 1997, 100, S45-S50.
9. Nathan C.: Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 2417-2423.
10. Azoulay E., Boulay G., Blayo M.C.: Effects of nitric oxide on resistance to bacterial infection in mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 1981, 7, 873-882.
11. Holt P.G., Finlay-Jones L.M., Keast D., Papadimitrou J.M.: Immunological function in mice chronically exposed to nitrogen oxides (NOx). *Environ. Res.* 1979, 19, 154-162.
12. Kroncke K., Fehsel K., Kolb-Bachofen V.: Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when and where? *Nitric oxide: Biol. Chem.* 1997, 1, 107-120.
13. Broillet M.C.: S-nitrosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 1999, 55, 1036-1042.
14. Xu L., Eu J.P., Meissner G., Stamler J.S.: Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 1998, 279, 234-237.
15. Vliet A., Eiserich J., Shigenaga M.: Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 160, 1-9.
16. Grisham M.B., Jourd'Heuil D., Wink D.A.: Nitric oxide: I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: Implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* 1999, 276, G315-G321.
17. Kong S.K., Yim M.B., Stadman E.R., Chock P.B.: Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH2 peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 3377-3382.
18. Brown G.C.: Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1411, 351-369.
19. Moellering D., McAndrew J., Patel R.P., Cornwell T., Lincoln T., Cao X. i wsp.: Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 358, 74-82.
20. Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M., Elespuru R.K., Misra M., Dunams T.M. i wsp.: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991, 254, 1001-1003.
21. Arroyo P.L., Hatch-Pigott V., Mower H.F., Cooney R.V.: Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants. *Mutat. Res.* 1992, 281, 193-202.
22. Routledge M.N., Wink D.A., Keefer L.K., Dipple A.: Mutations induced by saturated aqueous nitric oxide in the pSP189 supF gene in human

- Ad293 and E. coli MBM7070 cells. *Carcinogenesis* 1993, 14, 1251-1254.
23. Zhuang J.C., Wright T.L., deRojas-Walker T., Tannenbaum S.R., Wogan G.N.: Nitric oxide-induced mutations in the HPRT gene of human lymphoblastoid TK6 cells and in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000, 35, 39-47.
24. Isomura K, Chikahira M, Teranishi K, i Hamada K. Induction of mutations and chromosome aberrations in lung cells following in vivo exposure of rats to nitrogen oxides. *Mutat. Res.* 1984, 136: 119-125.
25. Tamir S., Tannenbaum S.R.: The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1288, F31-F36.
26. Laval F., Wink D.A.: Inhibition by nitric oxide of repair protein, O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyl transferase. *Carcinogenesis* 1994, 15, 443-447.
27. Graziewicz M., Wink D.A., Laval F.: Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms for NO-mediated DNA damage. *Carcinogenesis* 1996, 17, 2501-2505.
28. Salgo M.G., Bermudez E., Squadrito G., Pryor W.: Peroxynitrite causes DNA damage and oxidation of thiols in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 322, 500-505.
29. Virág L., Scott G.S., Antal-Szalmás .P, O'Connor M., Ohshima H., Szabó C.: Requirement of Intracellular Calcium Mobilization for Peroxynitrite-Induced Poly(ADP-Ribose) Synthetase Activation and Cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 1999, 56, 824-833.
30. Messmer U.K., Ankarcona M., Nicotera P., Brune B.: p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Letters* 1994, 355, 23-26.
31. Forrester K., Ambs S., Lupold S.E., Kapust R.B., Spillare E.A., Weinberg W.C. i wsp.: Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase (NOS2) expression by wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 2442-2447.
32. Ho Y.S., Wang Y.J., Lin J.K.: Induction of p53 and p21/WAF1/CIP1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells. *Mol. Carcinogenesis* 1996, 16, 20-31.
33. Calmels C., Hainaut P., Ohshima H.: Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 1997, 57, P3365-P3369.
34. Fujimoto H., Sasaki J., Matsumoto M., Suga M., Ando Y., Iggo R. i wsp.: Significant correlation of nitric oxide synthase activity and p53 gene mutation in stage I lung adenocarcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 1998, 89, 696-702.
35. Routledge M.N., Wink D.A., Keefer L.K., Dipple A.: DNA sequence changes induced by two nitric oxide donor drugs in the supF assay. *Chem. Res. Toxicol.* 1994, 7, 628-632.
36. Juedes M.J., Wogan G.N.: Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat. Res.* 1996, 349, 51-61.
37. Kelman D.J., Christodoulou D., Wink D.A., Keefer L.K., Srinivasan A., Dipple A.: Relative mutagenicities of gaseous nitrogen oxides in the supF gene of pSP189. *Carcinogenesis* 1997, 18, 1045-1048.
38. Keane J.F.J., Simon D.I., Stamler D.S., Jaraki O., Scharfstein J., Vita J.A., Loscalzo J.: NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J. Clin. Invest.* 1993, 91, 1582-1589.
39. Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J., Stamler J.S.: The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 9027-9032.
40. Yadav J.S., Seth N.: Effect of NO<sub>x</sub> on the somatic chromosomes of goldsmiths. *Environ. Health Persp.* 1998, 106, 643-647.
41. Yu S., Hung L., Lin C.: cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation* 1997, 95, 1269-1277.
42. Guo K., Andres V., Walsh K.: Nitric oxide-induced down-regulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1998, 97, 2066-072.
43. Shackelford R.E., Kaufmann W.K., Paules R.S.: Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ. Health Perspect.* 1999, 107 (Suppl. 1), 5-24.
44. Ishida A., Sasaguri T., Kosaka C., Nojima H., Ogata J.: Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 10050-10057.
45. Lepoivre M., Chénais B., Yapo A.: Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 1990, 266, 14143-14149.
46. Cifone M.G., Festuccia C., Cironi L., Cavallo G., Chessa M.A., Pensa V. i wsp.: Induction of the nitric oxide-synthesizing pathway in fresh and interleukin 2-cultured rat natural killer cells. *Cell. Immunol.* 1994, 157, 181-186.
47. Griscavage J.M., Rogers N.E., Sherman M.P., Ignarro L.J.: Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J. Immunol.* 1993, 151, 6329-6337.
48. Assreuy J., Cunha F., Liew F., Moncada S.: Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1993, 108, 833-837.
49. Sheffler L.A., Wink D.A., Melillo G., Cox G.W.: Exogenous nitric oxide regulates IFN-gamma plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages. *J. Immunol.* 1995, 155, 886-894.
50. Peng H.B., Spiecker M., Liao J.K.: Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. *J. Immunol.* 1998, 161, 1970-1976.
51. Colasanti M., Pershini T., Menegazzi M., Mariotto S., Giordano E., Caldarella C.M. i wsp.: Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26731-26733.
52. Griscavage J.M., Fukuto J.M., Komori Y., Ignarro L.J.: Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. Role of tetrahydrobiopterin in modulating the inhibitory action of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 21644-21649.
53. Rogers N.E., Ignarro L.J.: Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, 189, 242-249.
54. MacDuff Sheehy A., Burson A., Black S.M.: Nitric oxide exposure inhibits endothelial NOS activity but not gene expression: a role for superoxide. *Am. J. Physiol.* 1998, 274, L883-L841.
55. Buga G.M., Griscavage J.M., Rogers N.E., Ignarro L.J.: Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ. Res.* 1993, 73, 808-812.

56. Black S.M., Heidersbach R.S., McMullan D.M., Bekker J.M., Johengen M.J., Fineman J.R. i wsp. Inhaled nitric oxide inhibits NOS activity in lambs: potential mechanism for rebound pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 1999, 277, H1849-H1856.
57. Brady T.C., Crapo J.D., Mercer R.R.: Nitric oxide inhalation transiently elevates pulmonary levels of cGMP, iNOS mRNA, and TNF-alpha. *Am. J. Physiol.* 1998, 275, L509-L515.
58. Weinberger B., Fakhrzadeh L., Heck D.E., Laskin J.D., Gardner C.R., Laskin D.L.: Inhaled nitric oxide primes lung macrophages to produce reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1998, 158, 931-938.
59. Hurshman A.R., Marletta M.A.: Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity. *Biochemistry* 1995, 34, 5627-5632.

Adres autora: Św. Teresy 8, 90-950 Łódź, e-mail: mstep@imp.lodz.pl

Nadesłano: 22.08.2001

Zatwierdzono: 28.09.2001