

JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA, BEATA SKŁADANOWSKA

*Zakład Biochemii, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika,  
Gagarina 7, 87-100 Toruń*

## TLENEK AZOTU — BIOSYNTeza I MECHANIZMY ODDZIAŁYWANIA NA PRZEMIANY METABOLICZNE

### WSTĘP

Wykrycie w 1987 roku w tkankach tlenu azotu (cyt. za SNYDER i BREDT 1992) oraz ustalenie, iż jest on głównym czynnikiem relaksacyjnym mięśni gładkich naczyń krwionośnych (ang. endothelium derived relaxing factor, EDRF), otworzyło nową kartę w poznawaniu mechanizmów przekazu informacji i koordynacji wielu funkcji biologicznych komórek (CALVER i współaut. 1992, BRUHWYLER i współaut. 1993, MARLETTA 1993, DEMBIŃSKA-KIEĆ i współaut. 1994, FURCHGOTT i ZAWADZKI 1980, FURCHGOTT 1993, GIBALD 1993, IGNARRO 1989).

Ten niezmiernie prosty związek okazał się ważnym i powszechnie syntetyzowanym czynnikiem o cechach hormonu tkankowego, wtórnego przekaźnika, modyfikatora struktury i aktywności enzymów oraz związkiem współuczestniczącym w odpowiedzi immunologicznej i mutagenezie. Tlenek azotu (NO) w temperaturze pokojowej jest bezbarwnym, względnie stabilnym gazem. W podwyższonej temperaturze, jak również pod wpływem wysokich ciśnień ulega reakcji dysproporcjonacji do  $N_2O$  i  $NO_2$ . Łatwo reaguje z tlenem cząsteczkowym w wyniku czego powstaje  $NO_2$ . W warunkach fizjologicznych występuje w formie wysoce paramagnetycznego wolnego rodnika  $NO^{\bullet}$  o bardzo krótkim okresie półtrwania, wynoszącym zaledwie kilka sekund (5–10 s), (GALLA 1993).

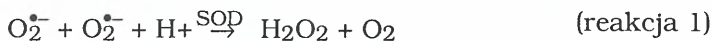
Tlenek azotu łatwo dyfunduje przez błony biologiczne. Jego potencjalna toksyczność w układach biologicznych wynika ze zdolności utleniania żelaza

---

Wykaz skrótów: AA — kwas arachidonowy; ADP — adenozyndifosforan; ATP — adenozyntrifosforan; cAMP — cykliczny 3',5'-adenozyntymonofosforan; cGMP — cykliczny 3',5'-gваноzyntymonofosforan; cADRP — cykliczna ADP ryboza; CM — kalmomodulina; DAG — diacyloglicerol; FAD — dinukleotyd flawinoadeninowy; FMN — mononukleotyd flawinowy; G — białko G;  $IP_3$  — inozytolotrifosforan; PIP — fosfatydyloinozytol; L-NMMA —  $N^G$ -monometylo-L-arginina; L-NAME —  $N^G$ -nitro-L-argininometylowy ester; ADMA — dwumetyloarginina; L-NIO — N-iminoetylo-L-ornityna; NOS — syntaza tlenu azotu; NAD — dinukleotyd nikotynamid adeninowy; NADP — fosfodinuukleotyd nikotynamido adeninowy; SOD — dysmutaza ponadtlenkowa; PP IX — żelazoprotoporfiryna IX; PAF — czynnik aktywujący płytki krwi; VIP — wazoaktywny peptyd jelitowy; PLC — fosfolipaza C; R — receptor; ER — retikulum endoplazmatyczne.

dwuwartościowego do trójwartościowego w żelazoporfirynach i białkach żelazo-siarkowych, jak również z możliwości interakcji z domenami-SH białek i związków biologicznie czynnych.

Podobnie jak reduktaza cytochromu P-450, syntaza tlenu azotu (NOS) uczestniczy w generacji anionorodnika ponadtlennowego,  $O_2^{\bullet-}$ , który w reakcji dysmutacji (reakcja 1) daje toksyczny produkt,  $H_2O_2$ . Produktem reakcji  $NO^{\bullet-}$  z anionorodnikiem ponadtlennowym,  $O_2^{\bullet-}$  jest anion nadtlenoazotowy (reakcja 2), związek o silnych właściwościach utleniających, zdolny do nitrowania reszt tyrozynowych białek i związków biologicznie czynnych (LANCASTER i współaut. 1992). Może on ponadto reagować z anionem  $HCO_3^-$  tworząc rodnik dwuwęglanowy. Unieczynnienie anionu nadtlenoazotowego w wyniku protonacji (reakcja 3) generuje rodnik hydroksylowy  $OH^{\bullet}$  (BARTOSZ 1995, MULLIGAN i współaut. 1991).



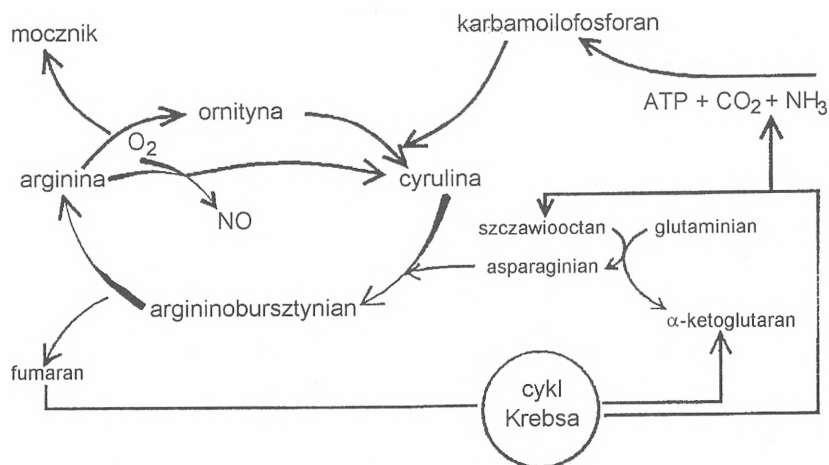
Reakcje syntezy  $H_2O_2$  i wolnych rodników dla przykładu zachodzą z dużą intensywnością w pobudzonych makrofagach (HIBBS i współaut. 1988, JESSUP i współaut. 1992), jak również w znacznie mniejszym nasileniu pod wpływem czynników stymulacyjnych w endotelium i komórkach nerwowych (BECKMAN i współaut. 1990, DAWSON i współaut. 1991, GRYGLEWSKI i współaut. 1986, HEINZEL i współaut. 1992, LI i współaut. 1990, PEARL i współaut. 1993, POU i współaut. 1992). W makrofagach reakcje te stanowią jedno z ogniw obrony, natomiast w pozostałych typach komórek oprócz funkcji obronnych mogą jednak stanowić zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania układów biologicznych.

#### SYNTEZA TLENU AZOTU W TKANKACH ZWIERZĘCYCH

W różnych komórkach tkanek zwierzęcych zachodzi endogenna synteza tlenu azotu z udziałem syntazy NO (E C 1. 14. 13. 39), (AISAKA i współaut. 1989, WHITTLE i współaut. 1989, PALMER i MONCADA 1989, KILBOURNE i współaut. 1990, RADOMSKI 1990, REES i współaut. 1989). Substratem reakcji jest aminokwas: L-arginina (kwas L  $\alpha$ -2-amino-5-guanidynowalerianowy) oraz tlen cząsteczkowy. Produktami reakcji są L-cytrulina i tlenek azotu. D-arginina nie stanowi substratu. Schemat przekształceń, które można traktować jako uproszczony cykl mocznikowy, przedstawiono na rysunku 1.

Synteza tlenu azotu zachodzi w takich komórkach, jak na przykład polimorfonuklearne neutrofile, monocyty, mastocyty, hepatocyty, komórki Kupferra, neurony, komórki endotelium (cyt. za DEMBIŃSKĄ-KIEĆ 1994, WHITTLE i współaut. 1989).

Nie rozstrzygniętą kwestią pozostaje sposób transportu argininy do tkanek pozbawionych enzymów warunkujących syntezę metabolitów cyklu mocznikowego. Dla przykładu w tkance mózgowej nie wykazano aktywności karbamoilo transferazy ornitynowej, jak również syntazy karbamoilo-fosforanu (cyt. za



Rys 1. Szlak biosyntezy tlenku azotu z argininy.

GALLA 1993). Spośród wielu wyizolowanych izoform NOS wydzielono dwa typy enzymów: konstytutywne, czyli stale syntetyzowane i indukcyjne, ulegające syntezie pod wpływem endogennych lub egzogennych czynników stymulacyjnych. Czynnikiem warunkującym ujawnienie się aktywności pewnych form NOS są jony wapnia i kalmodulina, inne działają niezależnie od powyższych czynników ( BREDT i współaut. 1990, HEVEL i współaut. 1991, LYONS i współaut. 1992, MAYER i współaut. 1990, POLLOCK i współaut. 1990, SCHMIDT i współaut. 1991, STUEHER i współaut. 1991, MARLETTA 1991).

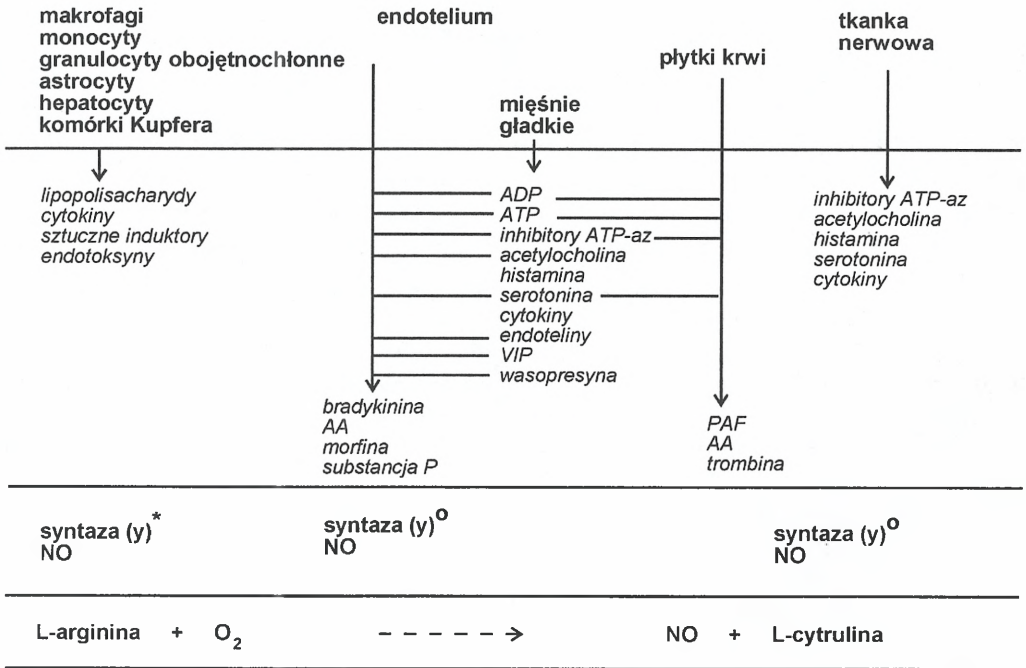
W tabeli 1 przedstawiono ogólny podział syntaz NO z uwzględnieniem stymulatorów NOS, jak również efektów NO na niektóre procesy metaboliczne.

Konstytutywne  $\text{Ca}^{2+}$  /kalmodulino-zależne syntazy NO zostały wyizolowane z komórek śródbłonna naczyń, płytek krwi, tkanki nerwowej nadnerczy i mięśni gładkich. Synteza tlenku azotu z udziałem konstytutywnych syntaz NO jest ciągła, może jednak podlegać stymulacji przez czynniki receptoro-zależne, takie jak: acetylocholina, bradykinina, ATP oraz czynniki receptoro-niezależne, jak polikationy,  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibitory ATP-azy (REES i współaut. 1990, RADOMSKI i współaut. 1990, MAYER i współaut. 1990, LEONE i współaut. 1991, KATUSIC i współaut. 1994).

Dla przykładu, enzym wyizolowany z mózdzku świni ulega 300-krotnej aktywacji przy  $1 \mu\text{M}$  stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$  (MAYER i współaut. 1990). Indukcyjne  $\text{Ca}^{2+}$  /kalmodulino-niezależne syntazy NO są wytwarzane po zadziałaniu czynnikami wywołującymi odporność immunologiczną; są immunologicznie odmienne od konstytutywnych (MATSUDA i współaut. 1990). Do stymulatorów tej grupy należą endotoksyny bakteryjne, interleukiny, neurotoksyny, czynnik nowotworowy,  $\gamma$ -interferon, lipopolisacharydy. Izoformy tego typu NOS wyizolowano z komórek układu odpornościowego jak makrofagi, granulocyty obojętnochłonne, komórki śródbłonna naczyń, jak również z komórek mięśni gładkich, astrocytów, hepatocytów, komórek Kupfera. Ekspresji tej grupy NOS w endotelium zapobiega podanie glukokortykoidów i deksametazonu (RADOMSKI i współaut. 1990, REES i współaut. 1990).

Tabela 1

Stymulatory indukcyjnych  $Ca^{2+}$  / kalmodulino-niezależnych i  $Ca^{2+}$  / kalmodulino-zależnych syntaz tlenu azotu



1. Generacja wolnych rodników
2. Modyfikacja białek
  - a. żelazosiarkowych
  - b. żelazoporfirynowych
  - c. interakcja z grupami -SH
  - d. nitrozylacja i nitrowanie

1. Wpływ na układy enzymatyczne działające z udziałem cykazy guanylanowej
2. Wpływ na ADP-rybozylację
3. Regulacja poziomu  $Ca^{2+}$ , z udziałem cADRP
4. Generacja reakcji wolnorodni-kowych
5. Modyfikacja białek

Konstrytuwne i indukowane syntazy NOS są związane ze strukturą membran lub też występują w formie rozpuszczalnej w cytosolu, ich masy cząsteczkowe wahają się w granicach 130–160 kDa. Dekodowane z cDNA syntazy z tkanki mózgowej, makrofagów i śródbłonka naczyń wykazują 50% homologii. Śródbłonkowa ludzka i mózgowa szczurza NOS o masie cząsteczkowej 144 kDa są w 52% homologiczne. Istnieją wyraźne różnice w długości C- i N-końcowych odcinków syntaz NO. N-końcowa partia syntazy NO z tkanki mózgowej jest najdłuższa. C-terminalne i N-terminalne partie enzymów (region 157–476) wykazują najwyższy stopień homologii. Odcinek N-końcowy według BREDTA



i współpracowników (1990), uczestniczy we wiązaniu argininy. Endotelialna NOS w partii N-końcowej zawiera region podlegający mirystylacji; regionu tego brak w syntazach NO neuronalnych i makrofagowych (BUSCONI i MICHEL 1993). Wszystkie trzy formy NOS posiadają również miejsce wiązania kalmoduliny mimo, iż indukcyjna makrofagowa NOS nie jest wrażliwa na  $Ca^{2+}$ . Sekwencje wiążące kalmodulinę (odcinek 725–745) charakteryzują się wysoką konserwatywnością. Badane syntazy NO posiadają również miejsca cAMP zależnej fosforylacji (BREDT i współpr. 1992). Neuronalna syntaza NO posiada pozatym również miejsce ulegające fosforylacji pod wpływem kinazy C oraz  $Ca^{2+}$ /kalmodulino-zależnej kinazy białkowej II. Każdy z wymienionych wyżej enzymów fosforyluje odrębne reszty serynowe. Fosforylacja zachodząca z udziałem kinazy C prowadzi do drastycznego spadku aktywności katalitycznej.

Dekodowane z cDNA sekwencje aminokwasowe dla różnych form NOS wykazały, że wszystkie izoformy są oksygenazami, NADPH zależnymi. Niezbędnymi kofaktorami oprócz dwóch cząsteczek NADHP są również FAD, FMN oraz tetrahydropteryna ( $H_4B$ ). (BREDT i współaut. 1991, LAMAS i współaut. 1992, LYONS i współaut. 1992, LOWENSTEIN i współaut. 1992). Dane o właściwościach molekularnych i kinetycznych syntaz tlenu azotu z makrofagów, komórek endotelialnych i nerwowych zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2

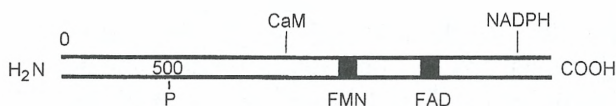
Właściwości syntetaz tlenu azotu wyodrębnionych z makrofagów, endotelium i mózgdzku

Źródło enzymu				
	Makrofagi	Endotelium	Mózdzek	Literatura
Masa cząsteczkowa formy aktywnej formy podjednostkowej	250 kDa 125 kDa, 130 kDa	135 kDa	279 kDa 155 kDa 150–160 kDa	b, c, d, e, f
$K_m$ dla L-arginy	19,0 $\mu$ M 2,8 $\mu$ M 16,0 $\mu$ M	2,9 $\mu$ M	2,2 $\mu$ M	a, b, c, d, e
Punkt izoelektryczny			pH 6,1	b
$K_i$ NNA $K_i$ NMA		0,16 $\mu$ M 0,94 $\mu$ M	0,90 $\mu$ M 1,60 $\mu$ M	b
$K_{0,5} Ca^{2+}$ $K_{0,5}$ kalmodulina	nie wymaga nie wymaga	0,30 $\mu$ M 3,50 nM	0,35 $\mu$ M 3,50 nM	b
Biopertyna	0,2 mola/130 kDa	0,1 mola/135 kDa	0,5 mola/150 kDa	c, e
Kofaktory	FMN 0,55/130 kDa FAD 1,10/130 kDa NADPH 1,00/130 kDa protoporfiryna IX	FMN FAD NADPH protoporfiryna IX	FMN FAD NADPH protoporfiryna IX	a, b, c, e, f
Forma	wolna	95% w formie związanej	wolna	b, d, g
Trójfluoroperazyna	brak hamowania		hamowana	b, d

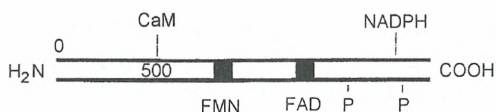
a — STUEHER i współaut. 1991, b — POLLOCK i współaut. 1991, c — MAYER i współaut. 1990, d — HEVEL i współaut. 1991, e — MARLETTA 1993, f — LOVENSTEIN i współaut. 1987, g — PALMER i współaut. 1987

Na rysunku 2 przedstawiono uproszczony schemat mózgowej i makrofagowej NOS oraz reduktazy cytochromu P-450 (LOWENSTEIN i współaut. 1992).

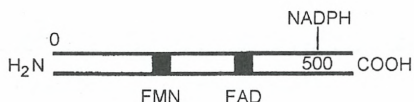
mózgowa syntaza tlenu azotu



makrofagowa syntaza tlenu azotu



reduktaza cytochromu P-450

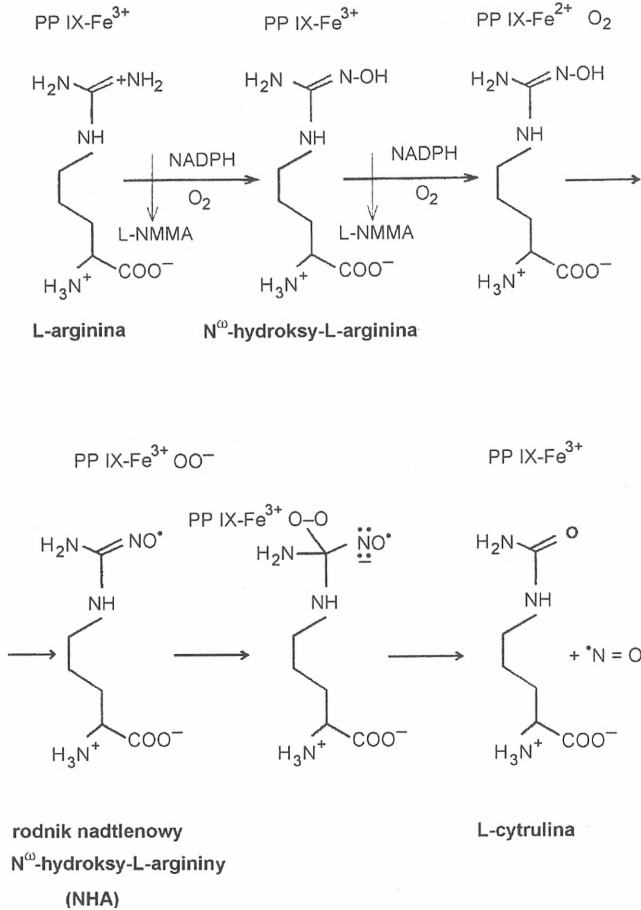


Rys. 2. Strukturalne podobieństwo między mózgową i makrofagową syntazą tlenu azotu i reduktazą cytochromu P-450.

P — miejsce fosforylacji; CaM — miejsce wiązania kalmoduliny.

Mimo istniejącej homologii miejsc wiążących niektóre koenzymy (NADP, FAD, FMN) pomiędzy izoformami NOS i reduktazą cytochromu P-450 (BRETT i współaut. 1991, 1992, DAWSON i współaut. 1991) istnieje istotna różnica między nimi, polegająca na występowaniu odmiennych miejsc fosforylacji. Funkcje metaboliczne NOS i reduktazy cytochromu P-450, mimo homologii budowy są odmienne. Pierwsza z nich uczestniczy w syntezie tlenu azotu, natomiast reduktaza cytochromu P-450 uczestniczy w metabolizmie szeregu związków endogennych, jak i egzogennych, jak na przykład środki farmakologiczne, toksyny, węglowodory aromatyczne; jest poza tym donorem elektronów dla oksygenazy hemowej rozkładającej hem (VERMA i współaut. 1993). W komórkach generujących NO zachodzą procesy przedstawione na rysunku 3 (MARLETTA 1993).

Tlenek azotu powstaje z końcowego azotu grupy guanidynowej L-argininy, formą pośrednią w procesach biosyntezy jest  $N^{0}$ -hydroksy-L-arginina (NHA). W pierwszym etapie jest wykorzystywana jedna cząsteczka NADPH, etap ten jest hamowany przez L-NMMA i przeprowadzają je zarówno konstytutywne, jak i indukcyjne syntetazy NOS. Dalsze etapy przemiany wymagają dodatkowego substratu, tlenu cząsteczkowego ( $O_2$ ), donorem tlenu nie jest woda (LEONE i współaut. 1991).

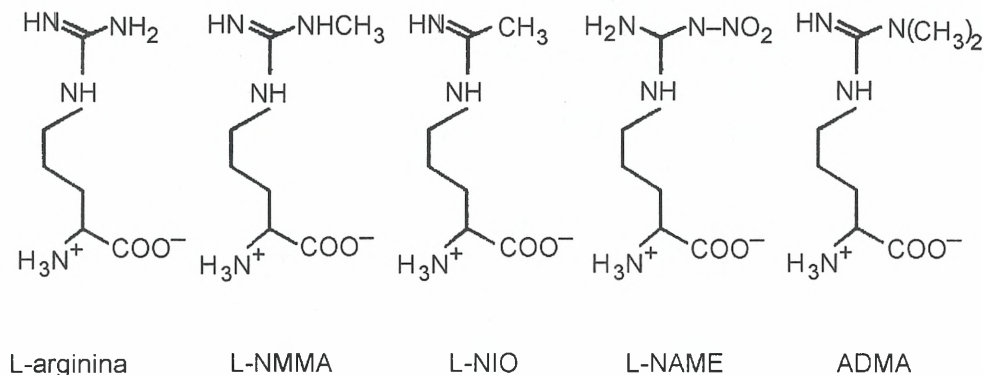


Rys. 3. Szlak biosyntezy tlenku azotu.

W drugim etapie reakcji następuje utlenienie następnej cząsteczki NADPH. Końcowymi produktami są cytrulina i tlenek azotu. Drugi etap reakcji, polegający na redukcji N<sup>ω</sup>-hydroksy-L-argininy (NHA) tlenem z udziałem NADH jest wrażliwy na CO, co wskazuje na nieodzowność hemu w procesach przekształcania NHA do tlenku azotu (MARLETTA 1993). Według KILBOURN i współpracowników (1993), L-arginina ulega hydroksylacji typu P-450 z wytworzeniem N<sup>ω</sup>-hydroksy-L-argininy z następującą oksydacją produktu hydroksylacji przez kompleks hem Fe<sup>3+</sup>. Utworzony rodnik NHA<sup>•</sup> w wyniku nukleofilowego ataku na węgiel gwanidynowy przez anion żelazonadtlenkowy ulega rozkładowi do NO i cytruliny. Tlenek azotu, jako produkt enzymatycznej syntezy, został zidentyfikowany przez BUSSE i MULSCH w 1991 r. NO w formie kompleksu z dwumetylotiokarbaminotyrozyną dawał charakterystyczny sygnał EPR.

W badaniach nad biosyntezą tlenku azotu oraz lokalizacją cyklu, jak również w badaniach nad skutkami fizjologicznymi końcowego produktu, tlenku azotu, wykorzystywano analogi strukturalne L-argininy, których budowę przedstawi-

no na rysunku 4 (AISAKA i współaut. 1989, KILBOURNE i współaut. 1990). Jeden z powyższych związków, ADMA, jest naturalnym składnikiem moczu, występuje również w tkance mózgowej i nerkach. Najprawdopodobniej pełni on funkcje naturalnego inhibitora syntazy tlenu azotu (VALLANCE i współaut. 1992, KOTANI i współaut. 1992).



L-NMMA — N<sup>G</sup>-monometylo-L-arginina; L-NIO — N-iminoetylo-L-ornityna;

L-NAME — N<sup>G</sup>-nitro-L-argininometylowy ester; ADMA — dwumetyloarginina

Rys. 4. Wzory strukturalne argininy i kilku jej analogów.

#### MECHANIZMY WPŁYWU TLENU AZOTU NA PRZEMIANY METABOLICZNE

Aktywacja NOS i synteza tlenu azotu w endotelium i komórkach nerwowych jest poprzedzona wzrostem poziomu Ca<sup>2+</sup>. Proces ten według BREDTA i współpracowników (1992) jest wywołany wiązaniem agonistów do receptorów; wynikiem jest aktywacja fosfolipazy C z kolejnym uwolnieniem inozytolotrójfosforanu (IP<sub>3</sub>) i diacyloglicerolu (DAG) z fosfatydyloinozytoli (PIP) błon. Uwolnione pod wpływem IP<sub>3</sub> z wewnątrzkomórkowych rezerw jony Ca<sup>2+</sup>, jak również napływ Ca<sup>2+</sup> do komórek przez kanały Ca<sup>2+</sup> — napięciowo niezależne w kompleksie z kalmoduliną, wywołują aktywację syntaz tlenu azotu.

System ten podlega kontroli (ang. down regulation), to znaczy zachodzi obniżenie aktywności syntazy tlenu azotu pod wpływem kinazy C zaktywowanej diacyloglicerolem. Wynikiem fosforylacji zachodzącej z udziałem kinazy C następuje drastyczne obniżenie aktywności enzymu. W niektórych tkankach, na przykład w mięśniach gładkich przewodu pokarmowego i fibroblastach, tlenek azotu obniża wewnątrzkomórkowe stężenie Ca<sup>2+</sup> (GARG i współaut. 1991, PUBLICOVER i współaut. 1993). Głównym efektem działania tlenu azotu (NO) na



przemiany metaboliczne jest aktywacja rozpuszczalnej formy cykazy guanylowej (DEGUCHI i YOSHIOKA 1982, GARG i HASSID 1991, SCHMIDT i współaut. 1991). Mechanizm aktywacji cykazy nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Badania nad wpływem hemoprotein (IGNARRO i współaut. 1986) na proces reaktywacji cykazy pozbawionej hemu wydają się wskazywać, że tlenek azotu (NO) uczestniczy w przeniesieniu hemu koniecznego dla aktywności cykazy, jak również indukuje odpowiednią konformację enzymu. Cykliczny GMP (cGMP) inicjuje kaskadę reakcji prowadzącą do aktywacji szeregu enzymów.

W liczbie aktywowanych białek jest ADP-rybocyklaza, enzym odpowiedzialny za uczynnienie kanałów jonowych c-ADRP zależnych, umożliwiających uwolnienie  $Ca^{2+}$  z błon retikulum endoplazmatycznego. Według LEE (1994) NO może uaktywniać cADRP hydrolazę, lub hamować cyklazę ADRP, co prowadzi do obniżenia poziomu wapnia w komórkach. Innym mechanizmem wpływu tlenu azotu na przemiany jest jego oddziaływanie na procesy regulacyjne zachodzące z udziałem  $NAD^+$ , polegające na ADP-rybozylacji (DIMMELER i współaut. 1992).

Możliwość swobodnej dyfuzji przez błony biologiczne, umożliwia przeniesienie receptoro-zależnego pobudzenia na komórki sąsiadujące (BRUHWYLER i współaut. 1993, KATUSIC i COSENTINO 1994). Takie oddziaływanie dla przykładu daje możliwość precyzyjnej regulacji napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych z udziałem izoform NOS obwodowego układu nerwowego, mięśni gładkich i endotelium (KATUSIC i COSENTINO 1994). Dane literaturowe o funkcji tlenu azotu w centralnym i obwodowym układzie nerwowym zostały podane w pracach przeglądowych DEBIŃSKIEJ-KIEĆ (1994) oraz BRUHWYLER i współpracowników (1993). Przedstawione mechanizmy wpływu tlenu azotu na przemiany nie zamykają listy możliwych oddziaływań tego prostego związku na przemiany biochemiczne.

## NITRIC OXIDE — BIOSYNTHESIS AND THE METABOLIC PROCESSES CONTROLLING MECHANISMS

### Summary

Formation of nitric oxide (NO) via the oxidation of L-arginine in mammalian cells by constitutive and inducible nitric oxide synthases (EC 1.14.13.39) is described. Nitric oxide controls and affects a number of critical physiological and metabolic processes. The article presents the most thoroughly characterized mechanisms by which nitric oxide regulates a variety of biochemical regulatory reactions at the cellular level.

### LITERATURA

- AISAKA K., GROSS S. S., GRIFFITH O. W., LEVI R., 1989. *N<sup>G</sup>-methylarginine, an inhibitor of endothelium derived nitric oxide synthesis, is potent pressor agent in the guinea pig does nitric oxide regulate blood pressure in vivo.* Biochim. Biophys. Res. Commun. 160, 881-886.
- BARTOSZ G. 1995. *Druga twarz tlenu.* PWN, W-wa, 54.
- BECKMAN J. S., BECKMAN T. W., CHEN J., MARSHALL P. A., FREEMAN B. A., 1990. *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury for nitric oxide and superoxide.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87, 1620-1624.
- BREDT D. S., HWANG P. M., SNYDER S. H., 1990. *Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide.* Nature (London). 347, 768-770.

- BREDT D. S., HWANG P. M., GLATT C. E., LOWENSTEIN C., REED R. R., SNYDERS S. H. 1991. *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. Nature (London) 351, 714–718.
- BREDT D. S., FERRIS D., SNYDER S. H., 1992. *Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C and calcium/ calmodulin protein kinase, identification of flavin and calmodulin binding sites*. J. Biol. Chem., 267, 10976–10981.
- BRUHUYLER J., CHLEIDE E., LIEGEOIS J. E., CARREER F., 1993. *Nitric oxide. A new messenger in the brain*. Neutricsi. Biobehavioral Reviews. 17, 373–384.
- BUSSE R., MULSCH A., 1991. *Molecular aspects of inflammation* Springer (Eds. SIES H. FLOHE L. ZIMMER G.), 189–205.
- BUSCONI L., MICHEL T., 1993. *Endothelial nitric oxide synthase*. J. Biol. Chem. 268, 841–8413.
- CALVER A., COLLIER J., VALLANCE P., 1992. *Nitric oxide and blood vessels: Physiological role and clinical implications*. Biochem. Education. 20, 130–135.
- DAWSON N. L., DAWSON T. M., LONDON E. D., BREDT D. S., SNYDER S. H., 1991. *Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures*. Proc. Nat. Acad. Sci USA., 88, 6368–6371.
- DAWSON T. M., BREDT D. S., FOTUHI M., HWAED P. M., SNYDER S. H., 1991. *Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and periferial tissues.*, 88, 7797–7809.
- DEGUCHI T., YOSHIOKA M., 1982. *L-arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells*. J. Biol. Chem., 257, 10147–10151.
- DEMBIŃSKA-KIEĆ A., GOŚCIŃSKI I., SZCZUDLIK A., 1994. *Labile products of vascular endothelium as mediators and modulators of the function of the central nervous system.*, J. Physiol. & Pharmacol. 45, 191–221.
- DIMMELER S., LOTTSPREICH F., BRUNE B., 1992. *Nitric oxide causes ADP-rybosilation and inhibition of glutaraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. J. Biol. Chem. 267, 16771–16774.
- FURCHGOTT R. F., 1993. [W:] *Mechanism of vasodilation* (red.) VANHOUTTE P.M., Vol. 4, Raven, New York, 401–404, cyt. za Angew. Chem. Int. Engl. 1993, Vol.32.
- FURCHGOTT R. F., ZAWADZKI J. V., 1980. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature (London) 288, 373–376.
- GALLA H.-J., 1993. *Nitric oxide NO, an intracellular messenger*. Angew. Chem. Int. Engl., 32, 378–380.
- GARG V. C., HASSID A., 1991. *Nitric oxide decreases calcium in Balb/C 3T3 fibroblasts by cyclic GMP-dependent mechanism*. J. Biol. Chem. 266, 9–12.
- GIBALD M. 1993. *What is nitric oxide and why are so many people studying it*. J. Clin. Pharmacol. 33, 488–496.
- GRANIER D. L., TAINTOR R. R., COOK J. L., HIBBS J. B., 1980. J. Clin. Invest. 65, 357–370.
- GRYGLEWSKI R. J., PALMER R. M., MONCADA S., 1986. *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium - derived vascular relaxing factor*. Nature (London) 320, 454–456.
- HEINZEL B., JOHN M., KLATT P., BOHMS E., MAYER B., 1992. *Ca<sup>++</sup>/Calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase*. Biochem. J. 281, 627–630.
- HEVEL J. M., WHITE K. A., MARLETTA M. A., 1991. *Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase- Identification as a flavoprotein.*, J. Biol. Chem. 266, 22789–22791.
- HIBBS J. B. Jr., TAINTOR R. P., VAVRIN Z., RACHLIN E. M., 1988. *Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 157, 87–94.
- IGNARRO L. J., ADAMS J. B., HORWITZ P. M., WOOD K. S., 1986. *Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange.*, J. Biol. Chem. 261, 4997–5002.
- IGNARRO L. J., 1989. *Endothelium-derived nitric oxide actions and properties*. Faseb J. 3, 31–36.
- JESSUP W., MOHR D., GIESEG S. P., DEAN R. T., STOCKER R. T., 1992. *The participation of nitric oxide in cell free and its restriction of macrophage mediated oxidation of low-density lipoproteins*. Biochim. Biophys. Acta 1180, 73–82.
- KATUSIC Z. S., COSENTINO F., 1994. *Nitric oxide synthase: From molecular biology to cerebrovascular physiology*. News in Physiol. Sciences 9, 64–67.
- KILBOURNE R. G., JUBRAN A., GROSS S. S., GRIFFITH O. W., LEVI R., ADAMS J. LODATO R. F., 1990. *Reversal of endotoxin-mediated shock by N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, 1132–1138.
- KOTANI K., VENOS S., SANO A., KAKIMOTO Y., 1992. *Isolation and identification of methylarginine from bovine brain*. J. Neurochem. 58, 1127–1129.
- LANCASTER J. R. Jr., LANGREHR J. M., BERGONIA H. B., MURASE N., SIMMONS R. L., ARFFMAN R. A., *EPR detection of heme and nonheme form containing protein, nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heart allograft*. J. Biol. Chem. 267, 10994–10998.

- LAMAS L., MARSDEN P. A., LI G. K., TEMPST P., MICHEL T., 1992. *Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 89, 6348-6352.
- LEE H. Ch., 1994. *A signaling pathway involving ADP-ribose, cGMP and nitric oxide*. News in Physiol. Sci. 9, 134-138.
- LEONE A. M., PALMER R. M., MONCADA S., 1991. *Constitutive and inducible nitric oxide synthase incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and cytrulline*. J. Biol. Chem. 266, 23790-28795.
- LI L. M., KILBORNE R. G., ADAMS J., FIDLER I. J., 1990. *Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine activated endothelial cells*. Cancer Res. 51, 2531-2535.
- LOWENSTEIN C. J., GLATT C. S., BRETT D. S., SNYDLER H. S., 1992. *Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 6711-6715.
- LYONS C. R., ORLOFF G. J., CUNNINGHAM J. M., 1992. *Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from murine macrophage cell line*. J. Biol. Chem. 267, 6370-6374.
- MARLETTA M. A., 1993. *Nitric oxide synthase structure and mechanism*. J. Biol. Chem. 268, 12231-12234.
- MARLETTA M. A., 1993. *Nitric oxide synthase: function and mechanism*, [W:] Chemistry & Biol. of Pteridins and Folates (red.) AYLING J.E., i in., Plenum Press, New York, (1993), 281-283.
- MAYER B., JOHN M., BOHME E., 1990. *Purification of Ca<sup>++</sup>/ calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum*. FEBS Letters. 277, 215-219.
- MATSUDA F., SHIN E. K., HIRABAYASHI Y., NAGOAKA H., YOSHIDA M. C., ZONG S. Q., HOUJO T., 1990. EMBOY 9, 2501-2506.
- MULLIGAN M. S., HEVEL J. M., MARLETTA M. A., WARD P. A., 1991. *Tissue injury by deposition of immune complexes is Leu-Arginine dependent*. Proc. Nat. Acad. Sci USA. 88, 6338-6342.
- PALMER R. M., MONCADA S. A., 1989. *A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells*. Biochim. Biophys. Res. Commun. 158, 348-352.
- PEARL R. G., 1993. *The antioxidant properties of an inhibitor of nitric oxide synthase*. Free Radical Biol. & Med. 14, 447-448.
- POLLOCK J. S., FORSTERMAN V., MITCHEL J. A., WARNER D. T., SCHMIDT H. H. W., NAKANE M., MURAO F., 1991. *Purification and characterization of particulate endothelium derived relaxing factor synthase from cultures and native bovine aortic endothelial cells*. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 88, 10480-10484.
- POU S., POU W. S., BRETT D. S., SNYDER S. H., ROSEN G. M., 1992. *Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase*. J. Biol. Chem. 267, 24173-24176.
- PUBLICOVER N. G., HAMMOND E. M., SANDERS K. M., 1993. *Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon*. Proc. natl. Acad. Sci. USA. 90, 2087-2091.
- RADOMSKI M. W., PALMER R. M. J., MONCADA S., 1990. *Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 10043-10047.
- REES D. D., PALMER R. M. J., MONCADA S., 1989. *Role of endothelium — derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3375-3378.
- REES D. D., CELLEK S., PALMER R. M. J., MONCADA S., 1990. *Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxic shock*. Biochim. Biophys. Res. Commun., 173, 542-547.
- SCHMIDT H-W., POLLACK J. S., NAKANA M., GORSKY L. D., FORSTERMANN V., MUROA F., 1991. *Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase activating factor synthase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 365-369.
- SNYDER S. H., BRETT D. S., 1992. *Biologiczna rola tlenku azotu*. Swiat Nauki 42-50.
- STUELER D. J., CHO H. J., KWON N. S., WEISE M. F., NATHAN C. F., 1991. *Purification and characterization of the cytokine induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7773-7777.
- WHITTLE B. J. R., LOPEZ-BELMONTE J., REES D. D., 1989. *Modulation of the vasopressor actions of acetylcholine, bradykinine, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation*. Brit. J. Pharmacol. 98, 646-652.
- VALLANCE P., LEONE A., CALVERA A., COLLIER J., MONCADA S., 1992. *Accumulation an endogeneous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure*. Lancet 339, 572-575.
- VERMA A., HIRSCH D. J., GLATT C. E., RONNELL G. V., SNYDER S. H., 1993. Science 381-384.