

JUSTYNA TADEUSIEWICZ, BEATA OLAS

*Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
E-mail: justynatadeusiewicz@wp.pl*

TLENEK AZOTU I TLENEK WĘGLA – DWA WAŻNE GAZOTRANSMITERY

WPROWADZENIE

Tlenek azotu ($\text{NO}^\cdot$), tlenek węgla (CO) i siarkowodór (H_2S) to trzy nieorganiczne gazy, określane mianem gazotransmiterów. $\text{NO}^\cdot$, CO i H_2S odgrywają istotną rolę w regulacji układu krążenia i układu nerwowego. Ponadto są one zaangażowane w szlaki transdukcji sygnału komórkowego. Mediatory te

wykazują m.in. działanie naczyniorozszerzające, regulują cykl komórkowy, apoptozę oraz stres oksydacyjny. Celem niniejszej pracy jest charakterystyka szlaków sygnałowych dwóch nieorganicznych gazotransmiterów, tlenku azotu i tlenku węgla.

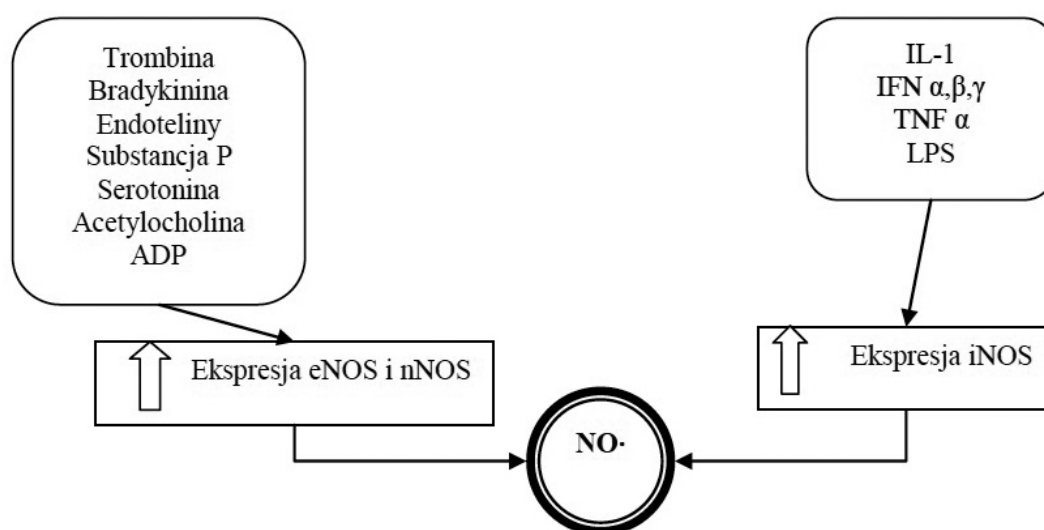
TLENEK AZOTU

Tlenek azotu posiada jeden niesparowany elektron, będąc zatem wolnym rodnikiem wykazuje dużą reaktywność. Cząsteczka $\text{NO}^\cdot$ jest lipofilna. Charakteryzuje się wielorakim działaniem w organizmie, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Tlenek azotu tworzy reaktywne formy tlenku azotu (RNOS). Jego okres półtrwania jest krótki, wynosi od 2 do 5 sekund (KOWALCZYK i współaut. 2006).

SYNTEZA TLENKU AZOTU W WARUNKACH *IN VIVO*

Synteza tlenku azotu w organizmie katalizowana jest przez enzym, syntazę tlenku azotu (NOS). Występują trzy izoformy syntazy tlenku azotu: neuronalna syntaza $\text{NO}^\cdot$ (nNOS), drugą jest indukowalna syntaza $\text{NO}^\cdot$ (iNOS), a ostatnia to śródbłonkowa (endotelialna) syntaza $\text{NO}^\cdot$ (eNOS). Konstitutywnymi formami enzymu są nNOS oraz eNOS (ALDERTON i współaut. 2001). Aktywność tych izoform związana jest z poziomem jonów wapnia oraz kalmoduliny w komórce.

Wzrost aktywności tych syntaz uwarunkowany jest działaniem czynników zwiększających poziom jonów Ca^{2+} w komórkach. Wśród nich wyróżnia się między innymi trombinę, bradykininę, endotelinę, substancję P (neuropeptyd), serotoninę, acetylocholinę czy adenozynodifosforan (ADP) (Ryc. 1). Na ich ekspresję wpływa również hipoksja, ćwiczenia fizyczne oraz poziom hormonów, takich jak estrogeny, itp. Wytwarzanie iNOS pobudzane jest przez działanie czynników prozapalnych, do których zalicza się między innymi interleukinę 1 (IL-1), interferony: α , β , γ (IFN α , β , γ), czynnik martwicy nowotworów α (TNF α) oraz lipopolisacharydy bakteryjne (LPS) (Ryc. 1). W związku z tym, aktywność indukowalnej NOS obserwuje się w komórkach żernych, takich jak: neutrofile, makrofagi oraz komórki Kupfera (KRZYŻANOWSKI i współaut. 1999). W przeciwieństwie do pozostałych izoform enzymu, aktywność iNOS nie jest związana z poziomem jonów Ca^{2+} w komórkach. Synteza tlenku azotu stymulowana poprzez iNOS jest bardziej wydajna, niż w



Ryc. 1. Wpływ różnych czynników na ekspresję syntaz tlenu azotu.

przypadku dwóch pozostałych izoform. Ilości wytwarzanego tlenu azotu są od 100 do 1000 razy większe (KOWALCZYK i współaut. 2006).

NO $\cdot$ w komórkach wytwarzany jest w trzech formach. Pierwszą z nich jest wolny rodnik, który wykazuje zdolność stymulacji syntezy cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP). Druga forma to składnik S-nitrozylowej struktury reaktywnych form tlenu azotu. Jest to sposób, w jaki hemoglobina magazynuje oraz transportuje NO $\cdot$. Tlenek azotu, po uwolnieniu z reaktywnych form tlenu azotu, zwiększa wytwarzanie cGMP. Trzecia forma to kompleks tlenu azotu z jonami metali, np. Fe $^{2+}$. Konsekwencją odłączenia NO $\cdot$ od jonów metali jest zwiększona synteza cGMP. Bez względu zatem na formę, w jakiej NO $\cdot$ jest wytwarzany w komórkach, stymuluje on produkcję cGMP (KRZYŻANOWSKI i współaut. 1999).

Syntaza tlenu azotu jest to enzym, który potrzebuje aż pięciu kofaktorów, do których zalicza się: FAD (dinukleotyd flawinoadeniny), FMN (mononukleotyd flawinowy), hem, NADPH, tetrahydrobiopterynę. Syntaza tlenu azotu odpowiada za pięcioelektronowy proces utleniania azotu aminowego w cząsteczce argininy. Produktem tej reakcji jest NO $\cdot$ oraz cytrulina (DAFF 2010).

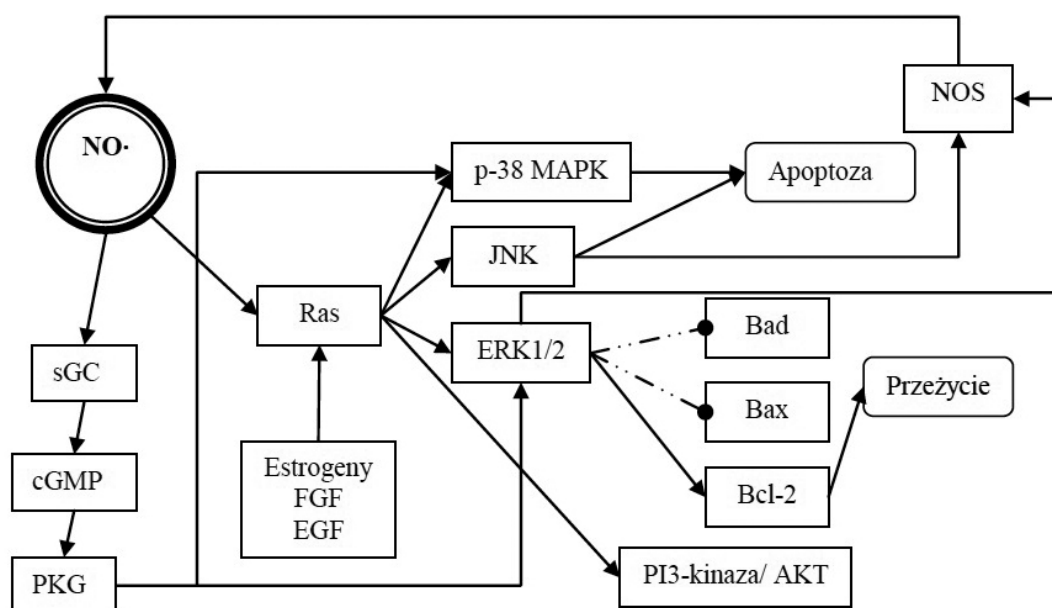
Tlenek azotu ulega reakcji z tlenem dając tlenek azotu (IV) (NO $_2$). NO $_2$ dimeryzuje, tworząc N $_2$ O $_4$, który w wyniku reakcji z wodą daje azotyny i azotany. Azotyny są również źródłem endogennego tlenu azotu. Ponadto NO $_2$ może reagować z NO $\cdot$, a wy-

nikiem tego oddziaływania jest N $_2$ O $_3$. Tlenek azotu jako rodnik oddziałuje z innymi wolnymi rodnikami. W wyniku reakcji NO $\cdot$ z anionorodnikiem ponadtlenuowym (O $_2^{\cdot-}$) powstaje nadtlenuazotyn. Działanie tlenu azotu w układach biologicznych można podzielić na działanie bezpośrednie lub pośrednie. Jest to zależne od tego, czy oddziałuje NO $\cdot$, czy reaktywne formy tlenu azotu (KOWALCZYK i współaut. 2006).

TLENEK AZOTU JAKO CZĄSTECZKA SYGNAŁOWA

Po raz pierwszy tlenek azotu jako cząsteczka sygnałowa zidentyfikowany był w układzie krążenia. NO $\cdot$ reguluje napięcie naczyniowe poprzez wpływ na komórki mięśni gładkich. NO $\cdot$ aktywuje rozpuszczalną cyklazę guanylanową (sGC), która określana jest jako receptor tlenu azotu. sGC katalizuje reakcję w wyniku, której z guanozynotrifosforanu powstaje cykliczny guanozynomonofosforan. cGMP aktywuje kinazy białkowe, fosfatazy i fosfodiesterazy oraz kanały jonowe (ROŻALSKI i WATAŁA 2005). NO $\cdot$ pełni również funkcję przekaźnika sygnału w układzie nerwowym. Swoje działanie wykazuje poprzez oddziaływanie z neurotransmiterem zależnym od jonów Ca $^{2+}$. W warunkach podwyższonego stężenia NO $\cdot$, jest on zaangażowany w apoptozę neuronów, a przez to uczestniczy w progresji chorób neurodegeneracyjnych. Jeśli jednak jego stężenie w komórkach jest niższe, to aktywuje on szereg mechanizmów chroniących komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Białko Ras, które wiąże się z GTP, pośredniczy w prze-

W stanach zapalnych NO[·] wytwarzany jest przez iNOS. Antygeny bakteryjne, wirusowe oraz niektóre pierwotniaki stymulują komórki krwi i śródbłónka naczyniowego do uwalniania czynników prozapalnych. Wśród tych mediatorów wyróżnia się wiele cytokin, m.in.: interleukinę -1 β (IL-1 β), -2 (IL-2), -6 (IL-6), TNF- α , INF γ . Czynniki prozapalne, po interakcji ze specyficznymi receptorami, aktywują fosfolipazę A₂ (PLA₂), C (PLC) i D (PLD). Aktywacja PLA₂ prowadzi do wytworzenia leukotrienów, szczególnie C₄, co aktywuje indukowalną syntazę tlenu azotu. PLA₂ aktywuje również syntazę tromboksanu. PLC jest zaangażowana w wytwarzanie trifosforanu inozytolu (IP₃) i diacyloglicerolu (DAG). PLC aktywuje kinazę białkową C (PKC). PKC zwiększa fosforylację treoniny w pozycji 495 eNOS w komórkach śródbłónka. W wyniku tego następuje zmniejszenie wydzielania NO[·]. Defosforylacja treoniny w pozycji 495 i fosforylacja seryny w pozycji 1177 powoduje aktywację eNOS. Takie działanie wykazuje kinaza Akt. Dodatkowo bradykinina stymuluje kinazę II zależną od kalmoduliny do fosforylacji seryny w pozycji 1177. Odnaleziono, co najmniej sześć miejsc fosforylacji, które odgrywają kluczową rolę w aktywacji eNOS. Cztery z nich to miejsca fosforylacji seryny (116, 617, 635, 1177), jedno treoniny (497) i tyrozyny (83). Skutkiem działania cytokin jest również aktywacja oksydazy ksantynowej oraz oksydazy zredukowanego dinukleotydu



Ryc. 2. Regulacja przeżycia i apoptozy przez tlenek azotu (--- •inhibicja).

nikotynoamidoadeninowego. W reakcji katalizowanej przez te oksydazy powstaje anionorodnik ponadtlenkowy, który powoduje uwolnienie histaminy i trombiny z komórek tucznych. Ułatwia to oddziaływanie krwinek białych z komórkami śródbłónka (SOKOŁOWSKA i WŁODEK 2001). W wyniku aktywacji komórek śródbłónka przez cytokiny prozapalne następuje translokacja czynnika jądrowego κ B (NF- κ B) z cytoplazmy do jądra komórkowego. W warunkach fizjologicznych NF- κ B jest związany ze swoim inhibitorem I- κ B. W stanach patologicznych dochodzi do fosforylacji i proteolitycznej degradacji I- κ B, a tym samym aktywacji NF- κ B, który natychmiast ulega translokacji do jądra komórkowego. W jądrze wiąże się on z specyficznymi sekwencjami promotorowymi różnych genów, włączając ich transkrypcję. NF- κ B zwiększa ekspresję czynników adhezyjnych, cytokin, chemokiny, które regulują odpowiedź zapalną poprzez kontrolowanie aktywacji leukocytów. Niskie stężenie NO $\cdot$ (wytwarzanego przez eNOS) ma działanie przeciwzapalne, zaś wysokie stężenie NO $\cdot$ (produkowanego przez iNOS) związane jest z rozwojem zapalenia i uszkodzeniem tkanek (ROGERS i FUSELER 2007).

Zwiększenie ekspresji eNOS następuje m.in. pod wpływem czynników wzrostu, histaminy czy sił ścinających. Czynniki te oddziałują przez Hsp90, czyli białko chaperonowe. Wytworzony NO $\cdot$ reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym, a powstający ONOO $\cdot$ produkowany jest w nadmiernych ilościach w przypadku takich chorób jak: miażdżyca, choroba Alzheimera czy uszkodzenie płuc. ONOO $\cdot$ oddziałuje na grupy tiolowe białek, powodując ich utlenianie, a w konsekwencji powstają disiarczki. Zaburza to równowagę między procesami prooksydacyjnymi, a antyoksydacyjnymi (SOKOŁOWSKA i WŁODEK 2001). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej powoduje inaktywację O $_2^{\cdot-}$, przez co wzmacnia się działanie tlenu azotu (ROŻALSKI i WATAŁA 2005).

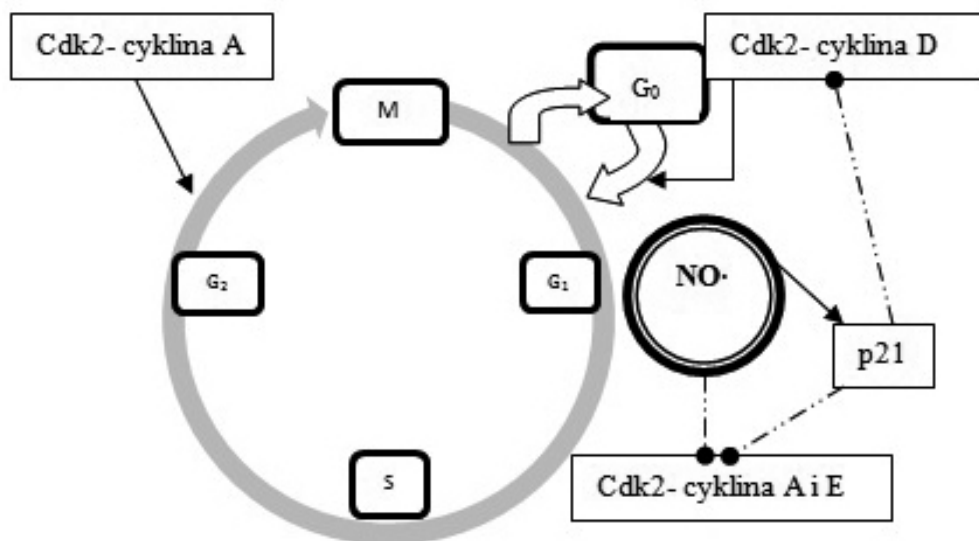
W reakcji NO $\cdot$ i RFT powstają RNOS, które powodują nitrozylację i nitrowanie aminokwasów, białek, lipidów oraz nukleotydów. W wyniku tych reakcji powstaje m.in. cykliczny 8-nitroguanozyno-3,5-monofosforan (8-nitro-cGMP), który uczestniczy w cytoprotekcyjnej odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny. Zwiększa on ekspresję genów ochronnych i aktywuje mechanizmy adaptacyjne komórki w warunkach stresu oksydacyjnego (AKAIKE i współaut. 2010). NO $\cdot$ zwiększa

aktywność syntazy γ -glutamylcysteinowej, powodując zwiększenie syntezy glutationu. Dzięki temu NO $\cdot$ wykazuje działanie antyoksydacyjne (SOKOŁOWSKA i WŁODEK 2001). Przeprowadzana przez NO $\cdot$ reakcja nitrozylacji chroni przed powstawaniem wolnych rodników. Nitrozylowe kompleksy NO $\cdot$ z hemoglobina, mioglobina i Fe $^{2+}$ zapobiegają tworzeniu m.in.: anionorodnika ponadtlenkowego i rodnika hydroksylowego. NO $\cdot$ chroni komórki przed skutkami nagromadzenia wolnych rodników, a także zapobiega peroksydacji lipidów (SOKOŁOWSKA i WŁODEK 2001).

Wykazano również, że tlenek azotu wpływa na CaMKI i CaMKII. CaMK to kinazy zależne od jonów Ca $^{2+}$ i kalmoduliny. Zaangażowane są one w przekazywanie sygnału w odpowiedzi na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Przyłączenie jonów Ca $^{2+}$ do kalmoduliny powoduje aktywację enzymów zależnych od Ca $^{2+}$, np. CaMKII, co wywołuje jej autofosforylację, zwiększając aktywność. Odgrywa to istotną rolę w przekazywaniu impulsów przez synapsy w czasie uczenia i zapamiętywania. CaMKII chroni przed niedokrwieniem mózgu, a CaMKI uczestniczy w rozwoju neuronów (ROŻALSKI i WATAŁA 2005, TAKATA i współaut. 2011).

Skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych następuje na skutek wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu Ca $^{2+}$. Kompleksy Ca $^{2+}$ i kalmoduliny wykazują zdolność aktywacji kinazy lekkich łańcuchów miozyny (LM). Dochodzi do fosforylacji LM, aktywacji miozyny, hydrolizy ATP i związanej z tym zmiany energii wiązań chemicznych na energię mechaniczną, co przekłada się na skurcz mięśni. NO $\cdot$ oddziałując przy pomocy cGMP zwiększa aktywność fosfatazy, która defosforyluje i inaktywuje miozynę. Miozyna w takim stanie nie tworzy kompleksu z aktyną i nie dochodzi do skurczu mięśni, a wręcz przeciwnie następuje ich rozkurcz. Inny mechanizm opiera się na otwieraniu kanałów potasowych. Powoduje to hiperpolaryzację błony i jednoczesne obniżenie aktywności kanałów jonowych zależnych od Ca $^{2+}$ (SOKOŁOWSKA i WŁODEK 2001).

Tlenek azotu odgrywa kluczową rolę w neurotransmisji. Jego działanie jest uzależnione m.in. od glutaminianu i asparaginianu. Wykazują one zdolność wiązania się z receptorami NMDA. Po przyłączeniu liganda, otwierają się kanały wapniowe, następuje napływ jonów Ca $^{2+}$ do komórek, tworzenie kompleksów jony Ca $^{2+}$ -kalmodulina i stymulacja nNOS. NO $\cdot$ dyfunduje z zakończeń



Ryc. 3. Regulacja cyklu komórkowego przez tlenek azotu (---•inhibicja).

postsynaptycznych do zakończeń presynaptycznych. W wyniku tego dochodzi do aktywacji kolejnych receptorów NMDA i nasilenia przewodnictwa synaptycznego. Nadmierna aktywność receptorów NMDA prowadzi do śmierci neuronów, poprzez apoptozę i nekrozę. Wynika to z faktu, że duże ilości NO[•] upośledzają łańcuch oddechowy w mitochondriach. Zmniejsza się stężenie ATP, pompy jonowe ulegają dysregulacji, otwierają się kanały jonowe. Do neuronów napływają jony Ca²⁺, K⁺, Na⁺, dodatkowo przenikają cząsteczki wody. Komórki nerwowe pęcznią, następuje proces lizy, a w kolejnym etapie nekroza. Tlenek azotu może wykazywać również pozytywne działanie w układzie nerwowym, a jego przykładem jest krótkotrwałe niedotlenienie mózgu. Skutkiem oddziaływania z receptorami NMDA i napływu jonów wapnia jest stymulacja nNOS oraz eNOS. Wytworzony w tym procesie NO[•] odpowiada za rozkurcz naczyń krwionośnych i hamowanie stanu zapalnego (SOKOŁOWSKA i WŁODEK 2001, XU 2007).

NO[•] wykazuje zdolność obniżania ciśnienia tętniczego krwi. W tym celu wykorzystywany jest mechanizm polegający na hamowaniu przez NO[•] proliferacji komórek

mięśni gładkich naczyń krwionośnych (ROŻAŁSKI i WATAŁA 2005). NO[•] hamuje aktywność kinaz MAP, co jest związane z fosforylacją przez PKG białek Raf. Kolejne działanie antyproliferacyjne opiera się na hamowaniu cyklino-zależnej kinazy 2 (Cdk2) oraz transkrypcji genu kodującego cyklinę A. Cdk2 w połączeniu z cyklina E reguluje przejście z fazy G₁ do S cyklu komórkowego. Ponadto cyklina A wiąże Cdk2 i Cdk1. Kompleks cykliny A i Cdk2 odpowiada za progresję przez fazę S cyklu, a kompleks tej cykliny z Cdk1 odpowiada za przejście z fazy G₂ do M. Inny mechanizm antyproliferacyjny opiera się na aktywowaniu przez NO[•] białka p21. Białko p21 wiąże się z kompleksami cyklin i zależnych od nich kinaz: cyklina E i Cdk2, cyklina D i Cdk4, cyklina A i Cdk2 hamując ich aktywność (Ryc. 3) (STĘPNIK 2001).

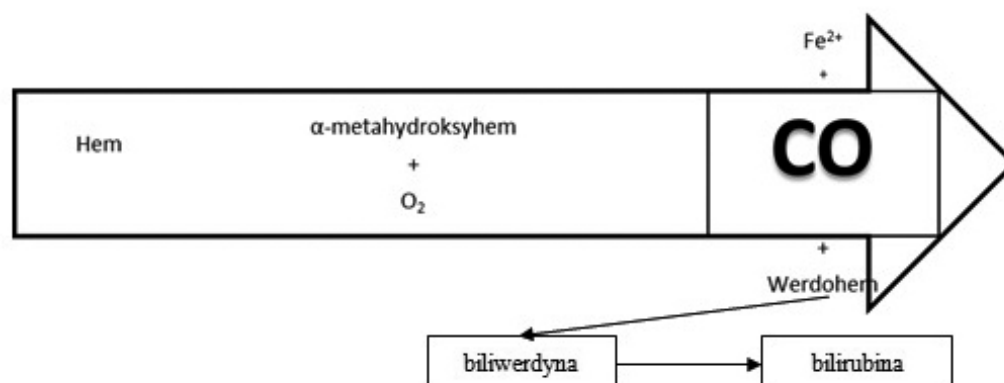
Tlenek azotu cechuje się licznymi pozytywnymi właściwościami, do których zalicza się m.in.: regulację napięcia mięśniowego, stanu zapalnego, chroni przed rozwojem nadciśnienia tętniczego. Ponadto NO[•] wykazuje lecznicze działanie w układzie nerwowym, chroniąc na przykład przed niedokrwieniem mózgu.

TLENEK WĘGLA

SYNTEZA TLENKU WĘGLA *IN VIVO*

Pierwsze doniesienia o syntezie tlenku węgla w organizmie pochodzą z 1963 r. (CO-

BURN i współaut. 1963). Wyniki badań potwierdzają, że pełni on istotną rolę w regulacji funkcjonowania układu krążenia i ner-



Ryc. 4. Synteza tlenku węgla w warunkach *in vivo*.

wowego, a także uczestniczy w transdukcji sygnału w komórkach (UFNAL i ŽERA 2010).

Synteza tlenku węgla w organizmie prowadzona jest przez oksygenazę hemową (HO) i związana jest z katabolizmem hemu, który jest rozkładany do biliwerdyny, CO oraz jonów Fe^{2+} . Wykorzystywane w tej reakcji elektrony dostarczane są przez zależną od NADPH reduktazę cytochromu P450. W początkowym etapie hem jest utleniany do α -metahydroksyhemu. W kolejnym etapie reaguje on z tlenem i powstaje werdohem oraz tlenek węgla. Werdohem ostatecznie ulega konwersji dając biliwerdynę, która na skutek działania reduktazy biliwerdyny tworzy bilirubinę. Dodatkowo, jony Fe^{2+} natychmiast ulegają związaniu przez ferrytynę (Ryc. 4).

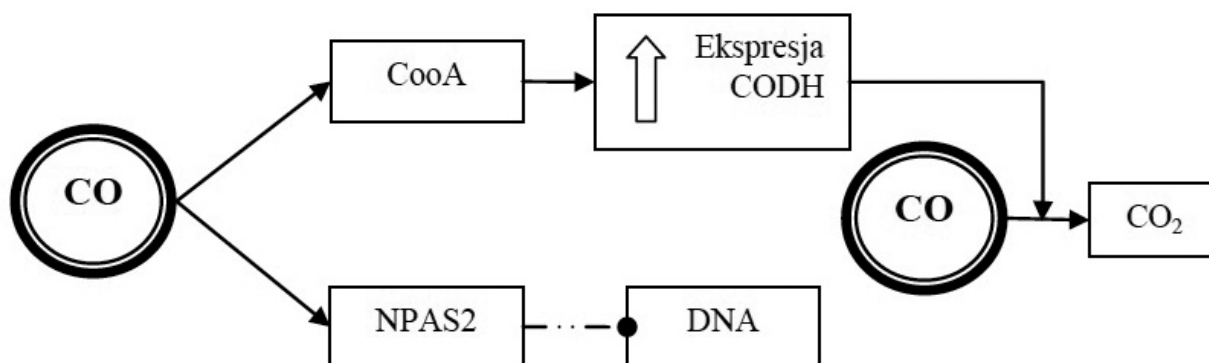
Oksygenaza hemowa występuje w trzech izoformach: HO-1, HO-2, HO-3; są one produktem ekspresji trzech różnych genów. HO-1 jest białkiem o masie 32 kDa, zaliczanym do białek szoku termicznego. HO-1 wykazuje działanie cytoprotekcyjne, chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym. Stres oksydacyjny i związany z nim obniżony poziom glutationu prowadzi do zwiększenia ekspresji genu kodującego HO-1. Ponadto, na ekspresję HO-1 wpływa również wysoki poziom hemu, hipoksja czy podwyższona temperatura ciała, metale ciężkie i promieniowanie ultrafioletowe (UV). HO-1 odpowiada za rozkład hemoglobiny pochodzącej ze starzejących się erytrocytów (OTTERBEIN i CHOI 2000, BEŁTOWSKI i współaut. 2004). HO-2 to forma konstytutywna enzymu o masie 36 kDa. Największą aktywność enzym ten wykazuje w mózgu. Jego funkcją jest katabolizm hemoprotein i wytwarzanie CO, pełniącego funkcję przekaźnika sygnału głównie w układzie nerwowym, a także w układzie krążenia.

Depolaryzacja neuronów prowadzi do zwiększenia aktywności HO-2 i syntezy CO (BOEHNING i współaut. 2003, BEŁTOWSKI i współaut. 2004). HO-3 wykazuje znaczny stopień podobieństwa sekwencji pierwszorzędowej w stosunku do HO-2, aczkolwiek jej aktywność jest niewielka. HO-3 to izoenzym o masie cząsteczkowej 33 kDa, w komórce pełni funkcję białka wiążącego hem, przez co reguluje wytwarzanie wolnych rodników (MCCOUBREY i współaut. 1997, BEŁTOWSKI i współaut. 2004).

Dziennie wytwarzane są znaczne ilości CO; jest to około 20 $\mu\text{mol/h}$, czyli około 500 μmol w ciągu doby. Głównym jego źródłem jest wspomniany wcześniej hem, ale CO wytwarzany jest również w wyniku fotooksydacji, peroksydacji lipidów i metabolizmu ksenobiotyków (DURANTE i współaut. 2006).

TLENEK WĘGLA JAKO CZĄSTECZKA SYGNAŁOWA

Tlenek węgla aktywuje rozpuszczalną cyklę guanylanową, wiążąc się z jej grupą hemową. Aktywację sGC powoduje również $\text{NO}^{\cdot}$, przy czym działanie $\text{NO}^{\cdot}$ jest znacznie silniejsze. $\text{NO}^{\cdot}$ zwiększa aktywność tego enzymu około 400 razy, zaś CO jedynie 4 razy, co wiąże się z mechanizmem ich działania. W cząsteczce hemu jon żelaza (Fe^{2+}) wiązany jest przez cztery pierścienie pirolowe i grupę imidazolową reszty histydyny. Tlenek azotu po utworzeniu wiązania koordynacyjnego z jonem Fe^{2+} powoduje rozerwanie wiązania z grupą imidazolową i wyeksponowanie jonu Fe^{2+} . W przypadku działania tlenku węgla, nie dochodzi do rozerwania wiązania z grupą imidazolową, przez co jon Fe^{2+} nie zmienia swojej pozycji. Na skutek wzrostu aktywności sGC zwiększa się produkcja cGMP. Tlenek węgla w przeciwieństwie do $\text{NO}^{\cdot}$ nie jest rozkładany w organizmie, więc może



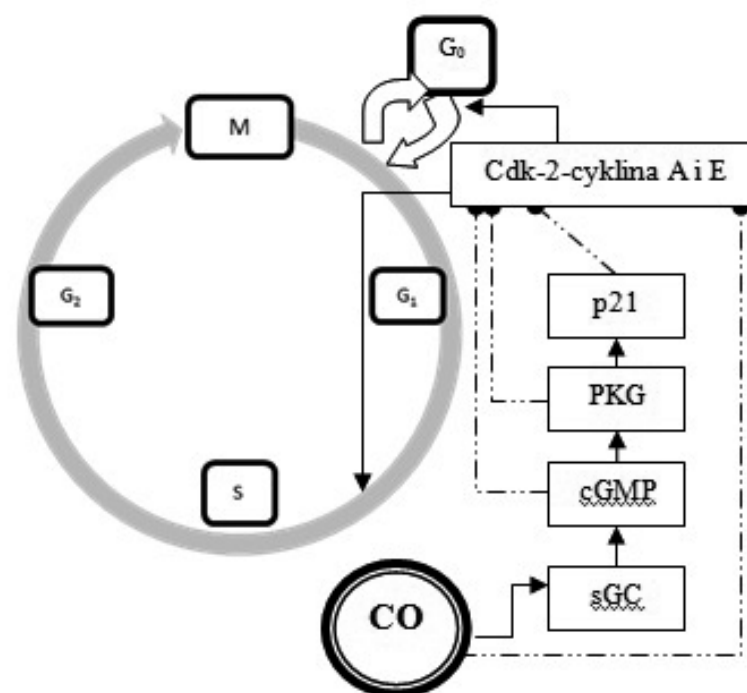
Ryc. 5. Regulacja czynników transkrypcyjnych przez tlenek węgla (-- •inhibicja).

działać dłużej (BEŁTOWSKI i współaut. 2004). CO wiąże się także z innymi hemoproteinami hamując ich aktywność, np. z cytochromem P450. Wynikiem tej inhibicji jest obniżenie poziomu syntezy kwasu 20-hydroksyeikozatetraenowego (20-HETE), który znacznie zwęża światło naczyń krwionośnych. CO aktywuje cyklooksigenazę kwasów tłuszczowych i zwiększa syntezę prostaglandyny E_2 (PGE_2).

CO pełni wielorakie funkcje w regulacji układu krążenia. Wykazuje on zdolność relaksacji mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych, przez co zwiększa światło naczyń. Dodatkowo reguluje ciśnienie krwi, procesy zapalne, a także hamuje agregację płytek krwi (BEŁTOWSKI i współaut. 2004, DURANTE i współaut. 2006). Działa antagonistycznie do NO , gdyż zwiększa wytwarzanie $IL-1\beta$. CO aktywuje również kinazę p38 MAPK, hamując jednocześnie aktywność kinazy ERK1/2. Dzięki temu tlenek węgla wykazuje działanie przeciwzapalne oraz hamuje proliferację i apoptozę komórek. CO reguluje ekspresję niektórych genów. Badacze zidentyfikowali czynnik transkrypcyjny (CooA) zawierający hem u bakterii *Rhodospirillum rubrum*. W obecności tlenku węgla CooA aktywuje ekspresję genu kodującego dehydrogenazę tlenku węgla (CODH), która utlenia CO do CO_2 (Ryc. 5). W komórkach eukariotycznych również występuje czynnik transkrypcyjny (NPAS2) regulowany przez CO. NPAS2 jest hemoproteiną, która po związaniu tlenku węgla nie oddziałuje z DNA. Aktywność NPAS2 obserwuje się w mózgu, uczestniczy on w regulacji cyklu dobowego (Ryc. 5) (BEŁTOWSKI i współaut. 2004).

Tlenek węgla wykazuje pozytywne działanie w wielu chorobach układu krążenia, np. w miażdżycy, w której dochodzi do zwiększonej syntezy CO. Jest to skutkiem zwiększe-

nia ekspresji HO-1 w komórkach śródbłónki i komórkach piankowych zmian miażdżycowych. Dodatkowo wzrost ekspresji HO-1 indukują utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości, rodnik nadtlenoazotynowy, czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), angiotensyna II (Ang II), a także hem pochodzący z uszkodzonych komórek. Istotne znaczenie HO-1 w patogenezie tej choroby potwierdzają przypadki pacjentów, u których brak ekspresji enzymu skutkowało rozwojem wczesnych zmian miażdżycowych. Działanie ochronne CO związane jest z hamowaniem proliferacji komórek mięśni gładkich. CO oddziałując na sGC zwiększa poziom cGMP, zmniejsza aktywność kinazy Cdk2 i ekspresji cykliny A. Cykl komórkowy jest zatrzymany w przejściu fazy G1 do S, co prowadzi do zahamowania proliferacji (Ryc. 6). Hamowanie cykazy guanylanowej lub kinazy białkowej G przez specyficzne inhibitory przywraca wzrost komórek mięśni gładkich. Badania wykazały, że CO hamuje agregację płytek krwi wykorzystując różne mechanizmy. Jeden z nich opiera się na oddziaływaniu z sGC. CO zmniejsza adhezję płytek do komórek śródbłónki w odpowiedzi na procesy zapalne. Poza działaniem przez sGC, tlenek węgla oddziałuje na aktywowane wapniem kanały potasowe, cytochrom P450, łańcuch oddechowu w mitochondriach oraz p38 MAP kinazę. Dotychczas nie udało się ustalić, jaką rolę odgrywają te mechanizmy w działaniu antyagregacyjnym CO. Płytki krwi zawierają aktywowane wapniem kanały potasowe, aczkolwiek istnieje niewielkie prawdopodobieństwo, że są one wykorzystywane. Przypuszczalnie nie jest to również związane z łańcuchem oddechowym, gdyż udział oddychania mitochondrialnego w agregacji płytek jest minimalny.

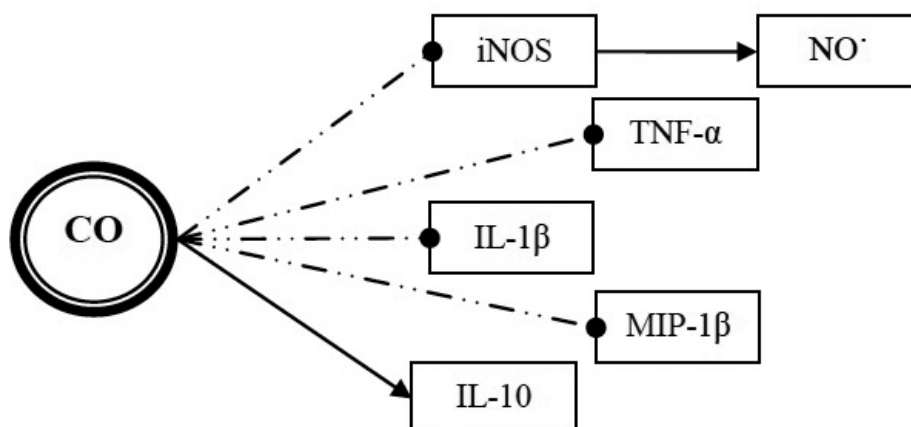


Ryc. 6. Regulacja cyklu komórkowego przez tlenek węgla (-- ••inhibicja).

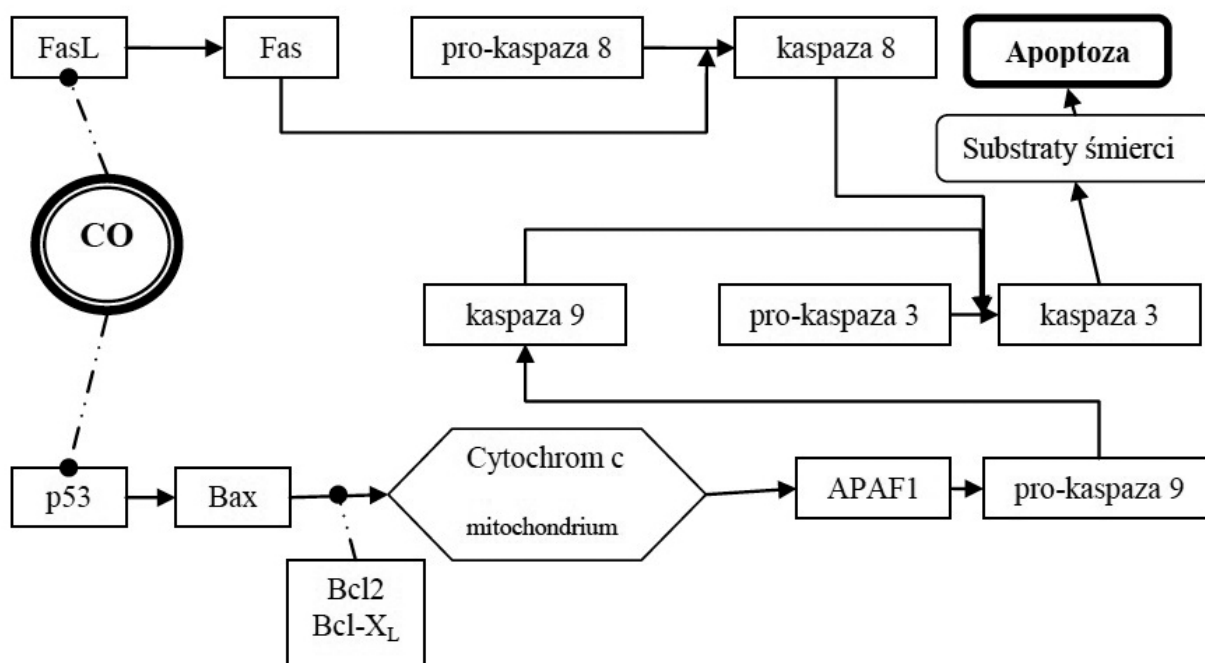
Mimo że mechanizm działania antyagregacyjnego CO, występującego w niskim stężeniu, jest nieznany wykazuje on takie działanie nawet w przypadku nadmiernej aktywacji płytek krwi (CHŁOPICKI i współaut. 2006). Działanie przeciwzapalne CO opiera się na hamowaniu ekspresji cytokin prozapalnych zależnych od LPS. Do cytokin tych należą: $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, białko zapalne makrofagów- 1β (MIP- 1β), CO podnosi zaś ekspresję cytokiny przeciwzapalnej- IL-10 . CO hamuje uwalnianie $\text{NO}^{\bullet}$ wytwarzanego przez iNOS (Ryc. 7). Ponadto CO hamuje uwalnianie histaminy z mastocytów i zapobiega aktywacji bazofi-

li (OTTERBEIN i współaut. 2000, BĘLTOWSKI i współaut. 2004, DURANTE i współaut. 2006).

Tlenek węgla hamuje apoptozę komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, poprzez aktywację sGC. Skutkiem wzrostu stężenia cGMP w komórkach jest zahamowanie apoptozy. Warto podkreślić, że inhibicja apoptozy komórek śródbłonna przez CO odbywa się poprzez aktywację kinazy p38 MAPK, jest to więc zupełnie odmienny mechanizm działania. CO hamuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego p53, który reguluje transkrypcję wielu białek, np. Bax. Aktywacja białka Bax przez p53 sprawia, że błona



Ryc. 7. Działanie przeciwzapalne tlenku węgla (-- ••inhibicja).



Ryc. 8. Regulacja apoptozy przez tlenek węgla (APAF1- czynnik aktywacji proteaz apoptotycznych) (--- •inhibicja).

mitochondrialna staje się przepuszczalna dla cytochromu c, przez co wypływa on z mitochondrium do cytoplazmy i aktywuje kaskadę sygnałową prowadzącą do śmierci komórki. Podsumowując, tlenek węgla hamuje apoptozę komórek mięśni gładkich poprzez hamowanie ekspresji białka p53 i uwalniania cytochromu c (LIU i współaut. 2002). Antyapoptotyczne działanie CO jest związane ze wzmożoną aktywnością HO-1. HO-1 ogranicza biodostępność jonów żelaza o działaniu prooksydacyjnym, uczestniczących w wytwarzaniu RFT. RFT odgrywają istotną rolę w kaskadzie sygnałowej prowadzącej do zaprogramowanej śmierci komórki (BROUARD i współaut. 2000). Ponadto, CO blokuje ligand (FasL), który przyłącza się do receptora powierzchniowego CD95 (Fas), będącego kluczowym regulatorem apoptozy. Związanie Fas z ligandem prowadzi do aktywacji kaspazy 8, która aktywuje kolejne kaspazy, a w konsekwencji następuje zaprogramowana śmierć komórki. Dodatkowo, CO utrzymuje wysoki poziom ekspresji białek antyapoptotycznych, takich jak Bcl2, czy Bcl-X_L. Tlenek węgla wykazuje działanie antyapoptotyczne wykorzystując liczne mechanizmy komórkowe (Ryc. 8) (ZHANG i współaut. 2003).

CO i HO-1 regulują przebieg cyklu komórkowego w fazie G₀/G₁, co jest związane z

obniżeniem aktywności cyklino-zależnej kinazy 2. Cdk2 jest odpowiedzialna za przejście G₀/G₁, a także G₁/S, gdyż odpowiada za fosforylację cykliny A i E. Zdolność CO do hamowania aktywności Cdk2 wynika z hamowania ekspresji kluczowych białek, wśród których wyróżnia się aktywatory Cdk2, cyklinę A i D1. CO zwiększa poziom ekspresji inhibitora Cdk2, którym jest białko p21 (patrz Ryc. 6) (DURANTE 2006).

CO wpływa na zależne od napięcia kanały wapniowe typu L. Czynniki te oddziałując na mitochondria, wiąże się z kompleksem IV w łańcuchu transportu elektronów, powoduje zwiększenie przepuszczalności błony i w konsekwencji wyciek elektronów, głównie z kompleksu III. Przeciek elektronów prowadzi do natychmiastowego tworzenia reaktywnych form tlenu. RFT hamują kanały przez oddziaływanie z trzema resztami cysteiny znajdującymi się na C-końcu łańcucha głównej podjednostki budującej kanał wapniowy. Skutkiem takiego działania CO jest zmniejszony napływ jonów Ca²⁺ przez kanały wapniowe typu L. CO wykazuje tym samym działanie kardioprotekcyjne, np. w chorobie niedokrwiennej serca (SCRAGG i współaut. 2008, PEERS i współaut. 2009).

Tlenek węgla odgrywa również istotną rolę w regulacji funkcji układu nerwowego.

CO reguluje oś podwzgórze-przysadka-nadnercza, rytm dobowy, odczuwanie zapachów, chemorepcję, prawidłowe słyszenie, widzenie, funkcję neuroendokrynną oraz pamięć. W chorobach neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, Alzheimer, Huntingtona, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne) dochodzi do upośledzenia wytwarzania CO, który może pełnić funkcję neuroprotekcijną. CO chroni komórkę przed powstawaniem RFT i nadmierną syntezą NO[•], a tym samym przed powstawaniem reaktywnych form azotu. Reaktywne formy tlenu i azotu to czynniki powodujące degenerację komórek nerwowych w wymienionych chorobach. Egzogenny tlenek węgla może odgrywać istotną funkcję ochronną, a nawet leczniczą w układzie nerwowym. Zmiana metabolizmu komórek nerwowych przez CO jest uzależniona od dawki i czasu inhalacji. Badania wykazały, że CO zapobiega apoptozie, zwiększa ekspresję Bcl-2, podnosi

poziom ATP, reguluje metabolizm tlenowy, zmniejsza syntezę mleczanu, redukuje zużycie glukozy, zwiększa aktywność oksydazy cytochromu c w komórkach nerwowych. Tlenek węgla wykorzystując wiele różnych mechanizmów wykazuje działanie neuromodulacyjne, neuroprotekcyjne i neuroterapeutyczne (MAHAN 2012).

Zarówno CO, jak i NO[•] aktywują rozpuszczalną cyklazę guanylanową, zwiększając stężenie cGMP. NO[•] i CO oddziałują na siebie wzajemnie, regulując swoją aktywność. NO[•] zwiększa ekspresję oksygenazy hemowej, enzymu odpowiedzialnego za syntezę CO, przez co potęguje tworzenie endogenne CO. Podobnie działa tlenek węgla, który wiąże się z grupą hemową iNOS, zwiększając wytwarzanie NO[•]. CO może działać jednak na zasadzie sprzężenia zwrotnego. W przypadku nadmiernego stężenia NO[•] hamuje on aktywność iNOS (KIM i współaut. 2008).

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują na niezmiernie ważną rolę, jaką pełnią te dwa nieorganiczne gazotransmitery w organizmie. NO[•] i CO wykorzystując liczne ścieżki sygnałowe, działają protekcyjnie oraz modulacyjnie w układzie krążenia, a także w układzie nerwowym. Warto też wspomnieć, że trzecim gazotransmiterem o istotnym znaczeniu jest siarkowodor. Drogi syntezy siarkowodoru oraz jego rolę, jako cząsteczki sygnałowej zostały szczegółowo opisane w pracy przeglądowej TADEUSIEWICZ i OLAS (2014). Wiele spośród mechanizmów działania tych gazotransmiterów nie zostało dotychczas poznanych, aczkolwiek ich zrozumienie będzie kluczowe. Już dziś trwają badania nad wykorzystaniem zmodyfikowanych leków o działa-

niu przeciwzapalnym zdolnych do uwalniania siarkowodoru. W przyszłości takie leki mogą zostać wykorzystane w farmakoterapii chorób układu sercowo-naczyniowego, a także chorób przewodu pokarmowego. Ponadto inhalacje przy użyciu CO, przeprowadzane na modelach zwierzęcych, cechują się wieloma leczniczymi właściwościami. Leczenie z wykorzystaniem tlenu azotu prowadzone jest od ponad 100 lat. Przeprowadzone dotychczas eksperymenty nad siarkowodorem, tlenkiem azotu oraz tlenkiem węgla są bardzo obiecujące. Niemniej jednak konieczne są dalsze doświadczenia pozwalające na dokładne poznanie i zrozumienie wszystkim mechanizmów ich działania.

TLENEK AZOTU I TLENEK WĘGLA – DWA WAŻNE GAZOTRANSMITERY

Streszczenie

Tlenek azotu (NO[•]), tlenek węgla (CO) oraz siarkowodor (H₂S), określane są mianem gazotransmiterów. Związki te odgrywają ważną rolę w regulacji procesów życiowych, gdyż uczestniczą w transdukcji sygnału w komórkach.

W warunkach *in vivo* tlenek azotu wytwarzany jest przy udziale neuronalnej (nNOS), indukowalnej (iNOS) oraz śródbłonkowej (eNOS) syntazy NO[•]. Tlenek azotu aktywuje rozpuszczalną cyklazę guanylową (sGC), która uznawana jest za receptor NO[•].

Czynnik ten reguluje przeżycie i śmierć komórek poprzez wpływ na kinazę białkową G (PKG) i białka Ras. Czynniki pro-zapalne zwiększają stężenie NO[•], który z kolei jest regulatorem stanu zapalnego. Wpływa on, także na kinazy zależne od jonów wapnia i kalmoduliny, uczestnicząc w procesie neurotransmisji.

W warunkach *in vivo* tlenek węgla wytwarzany jest przez oksygenazę hemową. CO podobnie jak tlenek azotu aktywuje sGC. Reguluje on ciśnienie krwi,

stan zapalny, a także hamuje agregację płytek krwi. Wpływa również na ścieżkę sygnałową kinazy p38-

-MAPK i hamuje aktywność ERK-1/2. CO reguluje więc ekspresję genów, przeżycie komórek i apoptozę.

NITRIC OXIDE AND CARBON MONOXIDE – TWO IMPORTANT GASOTRANSMITTERS

Summary

Nitric oxide (NO[•]) and carbon monoxide (CO), like hydrogen sulfide (H₂S), are commonly known as gasotransmitters. These compounds play a number of important functions in regulation of many life processes inter alia they are involved in cellular signaling pathways.

In vivo nitric oxide is synthesized by neuronal (nNOS), inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) nitric oxide synthase. NO[•] activates soluble guanylate cyclase (sGC), which is defined as the receptor for nitric oxide. NO[•] regulates cell survival and death by taking part in the signaling pathway of protein kinase G (PKG) and Ras. Proinflammatory

factors increase the level of NO[•], which regulates inflammation. NO[•] affects calcium and calmodulin dependent kinases, participating in the process of neurotransmission.

In vivo carbon monoxide is synthesized by heme oxygenase (HO). CO, like NO[•], activates sGC, regulates blood pressure and inflammatory processes. Moreover, CO inhibits platelet aggregation. It affects p38 – MAPK (Mitogen Activated Kinase) signaling pathway, and inhibits activity of ERK-1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2). CO regulates gene expression, cell survival and apoptosis.

LITERATURA

- AKAIKE T., FUJII S., SAWA T., IHARA H., 2010. *Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide*. Nitric Oxide 23, 166–174.
- ALDERTON W. K., COOPER C. E., KNOWLES R. G., 2001. *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem. J. 357, 593–615.
- BEŁTOWSKI J., JAMROZ A., BORKOWSKA E., 2004. *Oksygenaza hemowa i tlenek węgla w fizjologii i patologii układu krążenia*. Post. Hig. Med. Dośw. 58, 83–99.
- BOEHNING D., MOON C., SHARMA S., HURT K. J., HESTER L. D., RONNETT G. V., SHUGAR D., SNYDER S. H., 2003. *Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2*. Neuron 40, 129–137.
- BROUARD S., OTTERBEIN L. E., ANRATHER J., TOBIASCH E., BACH F. H., CHOI A. M. K., SOARES M. P., 2000. *Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis*. J. Exp. Med. 192, 1015–1025.
- CHŁOPICKI S., OLSZANECKI R., MARCINKIEWICZ E., ŁONNICKA M., MOTTERLINI R., 2006. *Carbon monoxide released by CORM-3 inhibits Chuman platelets by a mechanism independent of soluble guanylate cyclase*. Cardiovasc. Res. 71, 393–401.
- COBURN R. F., BLAKEMORE W. S., FORESTER R. E., 1963. *Endogenous carbon monoxide production in man*. J. Clin. Invest. 42, 1172–1178.
- DAFF S., 2010. *NO synthase: structures and mechanisms*. Nitric Oxide 23, 1–11.
- DURAN W. N., BRESLIN J. W., SÁNCHEZ F. A., 2010. *The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability*. Cardiovasc. Res. 87, 254–261.
- DURANTE W., JOHNSON F. K., JOHNSON R. A., 2006. *Role of carbon monoxide in cardiovascular function*. J. Cell. Mol. Med. 10, 672–686.
- KIM H. S., LOUGHRAN P. A., BILLIAR T. R., 2008. *Carbon monoxide decreases the level of iNOS protein and active dimer in IL-1b-stimulated hepatocytes*. Nitric Oxide 18, 256–265.
- KOWALCZYK E., KOPFF M., BŁASZCZYK J., FIJAŁKOWSKI J., KOWALSKI J., 2006. *Metabolizm tlenku azotu*. Wiadomości Lekarskie 59, 889–892.
- KRZYŻANOWSKI M., GOS T., HAUSER R., 1999. *Znaczenie tlenku azotu dla medycyny nie tylko sądo-
wej*. Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii 49, 23–30.
- LIU X., CHAPMAN G. B., PEYTON K. J., SCHAFER A. I., DURANTE W., 2002. *Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc. Res. 55, 396–405.
- MAHAN V. L., 2012. *Neuroprotective, neurotherapeutic, and neurometabolic effects of carbon monoxide*. Med. Gas Res. 2, 1–7.
- MCCOUBREY W. K., HUANG T. J., MAINES M. D., 1997. *Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3*. Eur. J. Biochem. 247, 725–732.
- OTTERBEIN L. E., BACH F. H., ALAM J., SOARES M., LU H. T., WYSK M., DAVIS R. J., FLAVELL R. A., CHOI A. M. K., 2000. *Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway*. Nat. Med. 6, 422–428.
- OTTERBEIN L. E., CHOI A. M. K., 2000. *Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress*. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 279, L1029–L1037.
- PEERS C., DALLAS M. L., SCRAGG J. L., 2009. *Ion channels as effectors in carbon monoxide signaling*. Commun. Integrat. Biol. 2, 241–242.
- ROGERS J. A., FUSELER J. W., 2007. *Regulation of NF-κB activation and nuclear translocation by exogenous nitric oxide (NO) donors in TNF-α activated vascular endothelial cells*. Nitric Oxide 16, 379–391.
- ROŻAŃSKI M., WATAŁA C., 2005. *Czynniki hematopoetyczne, angiogenne i o aktywności naczyniowej*. [W:] *Biologia molekularna człowieka*. LEWINSKI A., LIBERSKI P., CZELEJ P. (red.). Wydawnictwo, Lublin, 351–368.
- SCHROETER H., BOYD C., SPENCER J. P. E., WILLIAMS R. J., CADENAS E., RICE-EVANS C., 2002. *MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide*. Neurobiol. Aging 23, 861–880.
- SCRAGG J. L., DALLAS M. L., WILKINSON J. A., VARADI G., PEERS C., 2008. *Carbon monoxide inhibits L-type Ca²⁺ channels via redox modulation of key cysteine residues by mitochondrial reactive oxygen species*. J. Biol. Chem. 283, 24412–24419.

- SOKOŁOWSKA M., WŁODEK L., 2001. *Dobre i złe strony tlenku azotu*. *Cardiol. J.* 8, 467–477.
- STĘPNIK M., 2001. *Molekularne aspekty toksycznego działania tlenku azotu*. *Medycyna Pracy* 52, 375–381.
- TADEUSIEWICZ J., OLAS B., 2014. *Siarkowodor – gaz nie tylko o właściwościach toksycznych*. *Kosmos* 63, 125–135.
- TAKATA T., TSUCHIYA Y., NATIO Y., WATANABE Y., 2011. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide*. *Nitric Oxide* 25, 145–152.
- UFNAŁ M., ŻERA T., 2010. *Rola tlenku azotu, siarkowodoru oraz tlenku węgla w regulacji układu krążenia i ich potencjał farmakoterapeutyczny*. *Kardiologia Polska* 5, 436–440.
- XU L., MABUCHI T., KATANO T., MATSUMURA S., OKUDA-ASHITAKA E., SAKIMURA K., MISHINA M., ITO S., 2007. *Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors*. *Nitric Oxide* 17, 18–24.
- ZHANG X., SHAN P., ALAM J., DAVIS R. J., FLAVELL R. A., LEE P. J., 2003. *Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38 α mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury*. *J. Biol. Chem.* 278, 22061–22070.