

NO-SYNTÁZA: BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI A FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM

BERNÁTOVÁ I., PECHÁŇOVÁ O.

NO SYNTHASE: BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND PHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS

The biology of nitric oxide — NO — received enormous interest of scientists of different scientific disciplines for last ten years. This interest resulted from unique role of NO in various physiological systems including the cardiovascular system, immune system and central and peripheral nervous system. In tissues, NO is synthesised from L-arginine by enzyme NO synthase. In present, several isoforms of NO synthase are reported.

The aim of this review is to summarise present knowledge on biochemical characterization and physiological implications of NO synthase isoforms. (Tab. 4, Fig. 3, Ref. 94.)

Key words: nitric oxide, NO synthase, isoform.

Bratisl Lek Listy 1998; 99:474–482

Biológii oxidu dusnatého — NO — sa v poslednom desaťročí venuje veľký záujem v rôznych vedných disciplínach. Tento záujem pramení z toho, že NO má nezastupiteľnú úlohu vo viacerých fyziologických procesoch najmä v kardiovaskulárnom systéme, imunitnom systéme a centrálnom a periférnom nervovom systéme. V tkanivách je NO produkovaný z L-arginínu za účasti enzýmu NO-syntáza. V súčasnosti je známych niekoľko izoformi NO-syntázy, ktoré sa líšia vo svojich biochemických vlastnostiach, lokalizácii a fyziologickom význame.

Cieľom predkladanej práce je sumarizovať súčasný stav poznatkov o jednotlivých izoformách NO-syntázy a ich význame vo fyziologických a patofyziologických procesoch. (Tab. 4, obr. 3, lit. 94.)

Kľúčové slová: NO-syntáza, oxid dusnatý, izoforma.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 8–9, s. 474–482

Biochemické vlastnosti spoločné pre všetky izoformy NO-syntázy

Reakciu vzniku radikálu NO \cdot (NO) z L-Arg v rôznych bunkách (tab. 1, 2) katalyzuje enzým NO-syntáza (EC.1.14.13.39). Dosaiaľ bolo charakterizovaných niekoľko izoformi NO-syntázy. Jednotlivé izoformy sú očíslované v poradi, v akom boli prvýkrát purifikované. Izoforma I bola prvýkrát izolovaná z neurónových a epitelových buniek. Expresiu izoformy II indukujú v makrofágoch a iných bunkách cytokíny a baktériové lipopolysacharidy. Izoforma III bola izolovaná z endotelových buniek. Všetky izoformy NO-syntázy využívajú na syntézu NO L-arginín ako substrát a kyslík ako kosubstrát. Michaelisova—Mentenovej konštanta K_{mL-Arg} NO-syntázy I je 1,4—2,2 $\mu\text{mol/l}$ (1, 2). K_{mL-Arg} NO-syntázy II zistili viacerí autori v rozsahu 2,8—32,3 $\mu\text{mol/l}$ (3, 4, 5).

Pollock a spol. (6) zistili K_{mL-Arg} pre izoformu III NO-syntázy ako 2,9 $\mu\text{mol/l}$.

Všetky izoformy NO-syntázy vyžadujú ako kofaktory NADPH, biopterín, flavinadenínindukleotid (FAD) a flavínmononukleotid (FMN) (3,6), pričom biopterín sa vždy viaže ako úplne redukovaný derivát (R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterín (BH_4) (6). Okrem uvedených kofaktorov izoformy I a III vyžadujú pre svoju úplnú aktivitu aj Ca^{2+} a kalmodulín (7). McMillan a spol. (8) ukázali, že všetky tri izoformy NO-syntázy obsahujú hem ako prostetickú skupinu. Vo všeobecnosti NO-syntázy pozostávajú z dvoch katalytických domén (9). Reduktázová doména obsahuje NADPH, FAD, FMN a kalmodulín, kým oxygenázová doména obsahuje hem a BH_4 . Flavíny sprostredkujú transport elektrónov z NADPH na hemové železo, ktoré v prítomnosti BH_4 a L-Arg katalyzuje aktiváciu molekulového kyslíka. Transport elektrónov závisí od naviazania kalmodulínu k NO-syntáze (obr. 1). BH_4 má v syntéze NO pravdepodobne dve funkcie. Naviazanie BH_4 k NO-syntáze konvertuje NO-syntázu do aktívneho dimerického konformačného stavu. Okrem toho sa naviazaný BH_4 zúčastňuje na vytvorení priaznivého oxidačno-redukčného prostredia nevyhnutného na oxidáciu L-Arg (9).

Okrem už spomenutej arginín- N^G -hydroxylázovej a N^G -hydroxyarginínmono oxidázovej aktivity, ktorých výsledkom je vznik NO a L-Cit, boli u NO-syntázy popísané aj ďalšie enzýmové aktivity (10), ktorých prehľad je uvedený v tabulke 3.

Oddelenie kardiovaskulárnej fyziológie Ústavu normálnej a patologickej fyziológie Slovenskej akadémie vied v Bratislave

The Department of Cardiovascular Physiology, The Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

Address for correspondence: I. Bernátová, Mgr. Oddelenie kardiovaskulárnej fyziológie ÚNPF SAV, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovakia.

Phone: +421.7. 326 271-4, Fax: +421.7.368 516, Internet: berna@unpf.savba.sk

Izoforma I*Biochemické vlastnosti izoformy I*

Izoforma I je konštitutívne exprimovaný enzým, ktorý bol prvýkrát purifikovaný z mozočku potkana a prasata (1, 2). V literatúre býva tento enzým tiež označovaný ako b-NOS (z anglického brain NO synthase), c-NOS (z anglického constitutive alebo Ca^{2+} -dependent NO synthase), bc-NOS (kombinácia predchádzajúcich dvoch označení) alebo n-NOS (z anglického neuronal NO synthase). Táto nomenklatura však nie je presná, pretože izoforma I je okrem mozgu a neurónov exprimovaná aj v iných bunkách a tkanivách a naopak, endotelová NO-syntáza (izoforma III) je tiež konštitutívna a jej aktivitu reguluje Ca^{2+} .

Izoforma I je cytoplazmový enzým. Relatívna molekulová hmotnosť (M_r) zistená elektroforetickou metódou v polyakrylamidovom géle za denaturačných podmienok (SDS/PAGE) býva od 150 do 160 kDa (1, 2). Bredt a spol. (11) a Nakane a spol. (12) získali cDNA kódujúcu izoformu I z mozgu potkana a človeka. Na základe zistených aminokyselinových sekvencií uvedení autori predpokladajú M_r NO-syntázy I v rozsahu 160 až 161 kDa (tab. 4), čo je v súlade s predchádzajúcimi výsledkami získanými elektroforetickou metódou.

Porovnaním aminokyselinových sekvencií izoformy I purifikovanej z mozgu potkana a človeka Bredt a spol. (11) a Nakane a spol. (12) zistili, že až 93% aminokyselinových sekvencií je totožných. To znamená, že NO-syntáza I je medzidruhovo vysoko konzervatívny enzým.

Xu a spol. (13) stanovili gén pre ľudskú NO-syntázu I pomocou fluorescenčnej hybridizácie in situ na chromozóme 12.

Regulácia aktivity NO-syntázy I

Izoformu I konštitutívne exprimujú rôzne druhy buniek, pričom jej expresia môže byť zvýšená estrogénmi (14). Marsden a spol. (15) zistili sekvenčnou analýzou cDNA, že prvý exón izoformy I môže mať až osem variantov. Transkripcia každého z ôsmich variantov exónu 1 začína zo samostatného promotora a závisí od prítomnosti špecifických transkripčných a strihových (splicing) faktorov v bunke. Posttranslačne môže byť izoforma I fosforylovaná na zvyškoch serínu a treonínu proteínkinázou (PK) II závislou od Ca^{2+} a kalmodulínu, PK A, PK C a PK G pričom fos-

Tab. 1. Bunky a tkanivá, v ktorých sa zistila expresia konštitutívnej NO-syntázy.**Tab. 1. Cells and tissues where constitutive NO synthase was found.**

Typ buniek	Izoforma	Živočíšny druh	Literatúra
kardiomyocyty	I, III	p	60
endotel aorty	III	k, p, č	44, 61, 45
neuróny mozgu	I, III	pa, p	1, 62, 63
miecha	I	p	64
epitel pľúc	I	p	65
epitel žalúdka	I	p	65
pankreatické β -bunky	I	p	65
kostrový sval	I	č	12

Skratky: č — človek, k - krava, p - potkan, pa — prasa

Abbreviations: č — human, k - cow, p — rat, pa — pig

Tab. 2. Bunky a tkanivá, v ktorých sa zistila expresia indukčnej NO-syntázy.**Tab. 2. Cells and tissues where inducible NO synthase was found.**

Typ buniek	Živočíšny druh	Literatúra
kardiomyocyty	p, mo, kr	66, 67
EB aorty	k, p	61
cievne HSB	kr, p	68, 69
makrofágy	p, č	70, 71
neutrofilly	p, č	72, 73
neuróny	p	74
astrocyty	č, my	75, 76
chondrocyty	č	77
hepatocyty	p, č	78, 79
Kupfferove bunky	p	80
pankreatické β -bunky	p	81
epitel obličky	p	82
epitel pľúc	ma, č	83, 84
fibroblasty pľúc	p	85
keratinocyty	č	86
fibroblasty kože	ma	87
ovária	p	88

Skratky: č — človek, k - krava, kr — králik, ma — mačka, my — myš, mo — morča, p — potkan, pa — prasa

Abbreviations: č — human, k - cow, kr — rabbit, ma — cat, my — mouse, mo — quinea pig, p — rat, pa — pig

Tab. 3. Prehľad reakcií katalyzovaných NO-syntázou. Reakcie 1a a 1b sú reakcie vzniku NO v bunkách. Reakcie 2-4 prebiehajú v neprítomnosti L-Arg (10).**Tab. 3. The reactions catalysed by NO synthase. NO is created by reactions 1a and 1b. The reactions 2-4 are going in absence of L-Arg.**

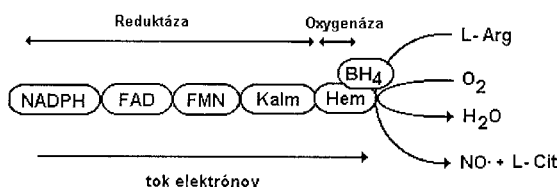
Aktivita Activity	Reakcia Reaction
1a. Arginín- N^G -hydroxyláza	$L\text{-Arg} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow L\text{-HA} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$
1b. N^G -hydroxyarginín monooxygenáza	$L\text{-HA} + 1/2(\text{NADPH} + \text{H}^+) + \text{O}_2 \rightarrow L\text{-Cit} + \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$
2. NADPH-diaforáza	$\text{NBT} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{redukovaná NBT} + \text{NADP}^+$
3. Cytochróm-c-reduktáza	$\text{Cyt}c + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{redukovaný Cyt}c + \text{NADP}^+$
4. NADPH-oxidáza	$1/2\text{NADPH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^- + 1/2(\text{NADP}^+ + \text{H}^+)$
	$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADP}^+$
5. Dihydropteridín reduktáza	$\text{BH}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{BH}_4 + \text{NADP}^+$

Skratky: L-HA — L-hydroxyarginín, BH_2 — dihydrobiopterín,

NBT — tetrazóliová modrá

Abbreviations: L-HA — N^G -hydroxy-L-arginine,

BH_2 — dihydrobiopterin, NBT — nitroblue tetrazolium



Obr. 1. Katalytické domény a koenzýmy NO-syntázy. Reduktázová doména NO-syntázy obsahuje NADPH, FAD, FMN a kalmodulín. Oxygenázová doména obsahuje hem a tetrahydrobiopterín (BH₄).
Fig. 1. Catalytical domains and coenzymes of NO synthase. Reductase domain of NO synthase involves NADPH, FAD, FMN and calmodulin. Oxygenase domain involves heme and 6(R)-5,6,7,8,-tetrahydrobiopterin (BH₄)

forylácia NO-syntázy I proteínkinázami II, A a C in vitro má za následok zníženie jej aktivity (16). Navyše aktivitu NO-syntázy I v bunke regulujú zmeny intracelulárnej koncentrácie vápnika. Pri koncentrácii Ca²⁺ 100 nmol/l je izoforma I inaktívna a plne aktívna je pri koncentrácii Ca²⁺ 500 nmol/l (2). Zároveň aktivita izoformy I úplne závisí od naviazania kalmodulínu.

Fyziologické funkcie izoformy I

NO-syntáza I bola identifikovaná v neurónoch CNS, v malom mozgu, predĺženej mieche, v periférnych nitrogických nervoch, v sympatikových nervoch a gliových bunkách (17). Okrem toho bola NO-syntáza I identifikovaná aj v iných bunkách a tkanivách (tab. 1). Viacerí autori využívajú na lokalizáciu NO-syntázy I jej NADPH-diaforázovú aktivitu (10), ktorú však majú viaceré enzýmy. Okrem toho Matsumoto a spol. (18) ukázali, že korelácia medzi histochemickým NADPH-diaforázovým farbením a imunocytochemickým farbením NO-syntázy I sa vyskytuje iba vo fixovaných preparátoch, kým v natívnych tkanivách sa táto korelácia nevyskytuje. Z uvedených skutočností vyplýva, že NADPH-diaforázové farbenie nie je pre NO-syntázu I dostatočne špecifické.

NO a neurotransmitter glutamát majú významnú funkciu v procese učenia sa a formovania pamäte. Garthwaite (19) zistil, že

Tab. 4. Molekulová charakteristika jednotlivých izoform NO-syntázy.

Tab. 4. Molecular characterization of NO synthase isoforms.

Izoforma	Tkanivo	Druh	Počet AMK	M _r kD	mRNA kb	
						Literatúra
I.	mozog	potkan	1429	160	10,5	11
	mozog	človek	1433	161	10	12
	makrofág	myš	1144	130	4	28
II.	makrofág	mačka	—	131	4,5	89
	HSB	potkan	1147	131	4	90
	hepatocyty	potkan	1147	131	4,5	91
	hepatocyty	človek	1153	131	4,5	92
III.	endotel	krava	1205	133	4,8	93
	endotel	človek	1203	133	4,8	94

Skratky: AMK — aminokyselina, M_r — relatívna molekulová hmotnosť, kb — kilobáza

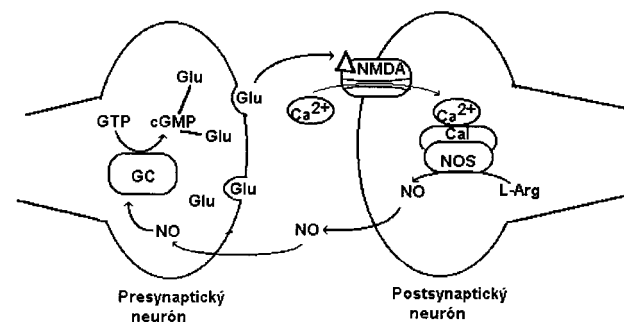
Abbreviations: AMK — amino acid, M_r — molecular mass, kb — kilobase

dôležitým stimulom pre aktiváciu NO-syntázy I je aktivácia N-metyl-D-aspartátového (NMDA) receptora pre glutamát (Glu). Po uvoľnení z presynaptického neurónu do synapsy sa Glu naviaže na NMDA receptor na postsynaptickom neuróne, čo vedie k vstupu vápnika do postsynaptického neurónu. V postsynaptickom neuróne Ca²⁺ aktivuje NO-syntázu I. Postsynaptický neurón produkuje NO, ktorý difunduje späť do presynaptického neurónu. V presynaptickom neuróne NO aktivuje cytozolovú guanylátcyklázu a zvyšuje hladinu cGMP, čo umocňuje uvoľňovanie Glu do synapsy (obr. 2). Uzavrie sa cyklus chemických dejov, ktorý následne vedie k ľahšiemu prenosu vzruchu v mieste synapsy (19). Bohme a spol. (20) zistili, že inhibítory NO-syntázy zhoršujú schopnosť učiť sa, čo potvrdzuje významnú úlohu NO v procese formovania pamäte.

NO produkovaný izoformou I kooperuje pri udržiavaní homeostázy vnútorného prostredia s NO, ktorý je produkovaný v endoteli izoformou III. NO produkovaný izoformou I redukuje cievny sympatikový tonus (21), a tým sa zúčastňuje na regulácii tonusu ciev. Tým NO prispieva k udržiavaniu normálneho tlaku a prietoku krvi.

Izoforma I v patofyziológii

Jednou z príčin, ktoré môžu viesť k zvýšenej produkcii NO v mozgu, je ischemia. Počas ischemie dochádza v mozgu k uvoľneniu veľkého množstva glutamátu. Glutamát aktivuje NMDA receptor, čo vedie k zvýšeniu intracelulárnej koncentrácie vápnika v neurónoch (22). Vápnik aktivuje NO-syntázu I závislú od Ca²⁺ a kalmodulínu a do okolia excitovaného neurónu sa uvoľní veľké množstvo NO. NO difunduje do susedných neurónov a inhibuje v nich životne dôležité enzýmy. Uvedená kaskáda dejov vedie k postupnému odumieraniu neurónov.



Obr. 2. Transmisia signálu cez synapsu. Uvoľnenie glutamátu (Glu) z presynaptického neurónu má za následok vtok vápnika do postsynaptického neurónu cez glutamátom aktivovaný N-metyl-D-aspartátový (NMDA) receptor. Vápnik aktivuje NO-syntázu a vzniknutý NO difunduje späť do presynaptického neurónu. V presynaptickom neuróne NO aktivuje guanylátcyklázu (GC) a vysoká hladina cGMP potencie ďalšie uvoľnenie Glu, čo vedie k opakovaniu cyklu.
Fig. 2. Signal transmission across a synapse. Release of glutamate (Glu) from the presynaptic neuron leads to activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and results in increase of Ca²⁺ in the postsynaptic neuron. Ca²⁺ activates neuronal NO synthase and NO is produced. Next, NO can diffuse back to presynaptic neuron and activate guanylate cyclase (GC). Elevation of cGMP in presynaptic neuron leads to release of Glu, and the cycle repeats.

Vysoká koncentrácia NO môže byť príčinou niektorých neurodegeneratívnych ochorení. V mozgu pacientov s diagnostikovanou Huntingtonovou chorobou korelovali miesta s najväčším počtom odumretých neurónov s oblasťami, ktoré v zdravom mozgu vykazovali najvyššiu aktivitu NO-syntázy. Zväčšovanie sa oblastí s toxickou koncentráciou NO v mozgu je pravdepodobne podstatou šíriaceho sa devastačného efektu Huntingtonovej choroby. Podobne Parkinsonova a Alzheimerova choroba môžu byť spôsobené toxickým vplyvom NO na neuróny (23). Nowicki a spol. (24) ukázali, že inhibitory NO-syntázy znižujú riziko poškodenia mozgu. Na druhej strane, použitie nešpecifických inhibítorov NO-syntázy napríklad pri mozgovom infarkte, môže mať negatívne dôsledky. Pri nešpecifickej inhibícii dochádza zároveň ku zníženiu produkcie NO v endotelových bunkách (EB) a k následnej adhezii neutrofilov na endotel, čo môže viesť k poškodeniu mozgu kyslíkovými radikálmi.

Izoforma II

Biochemické vlastnosti izoformy II

Izoforma II NO-syntázy nie je exprimovaná konštitutívne, ale jej expresiu môžu indukovať v makrofágoch a iných bunkách bakteriálne lipopolysacharidy (LPS) alebo cytokíny (3, 4, 5). Izoforma II býva tiež označovaná ako iNOS (z anglického inducible nitric oxide synthase) alebo macNOS (z anglického macrophage nitric oxide synthase).

NO-syntázu II prvýkrát purifikovali nezávisle od seba Stuehr a spol. (3) a Hevel a spol. (4) z mačacích makrofágoch. Odvtedy viacerí autori získali cDNA izoformy II NO-syntázy z rôznych typov buniek (tab. 2, 4). Zistené aminokyselinové sekvencie zodpovedali proteínu s M_r od 130 do 131 kDa. Okrem izoformy II, ktorá je cytoplazmová a vyskytuje sa v makrofágoch a iných bunkách, niektorí autori opisali v makrofágoch aj indukčnú NO-syntázu naviazanú na bunkové membrány, ktorá je v literatúre označená ako izoforma IV (7). Na základe imunologických pozorovaní je pravdepodobné, že izoformy II a IV sú rovnaký proteín, aj keď posttranslačná modifikácia, ktorá konvertuje cytoplazmový proteín na membránový nie je presne známa (25).

Na rozdiel od izoformy I, nie je NO-syntáza II závislá od vápnika. Xie a spol. (26) však ukázali, že izoforma II má väzbové miesto pre kalmódulín. V myších makrofágoch je väzba kalmódulínu s NO-syntázou II aj v neprítomnosti Ca^{2+} taká pevná, že kalmódulín sa môže považovať za podjednotku NO-syntázy II (27).

Ľudský gén pre NO-syntázu II lokalizovali Xu a spol. (13) na chromozóme 17.

Regulácia aktivity izoformy II

Lowenstein a spol. (28) analyzovali časť 5'-konca génu pre izoformu II z myších makrofágoch. Uvedení autori zistili, že iniciačnému miestu mRNA pre NO-syntázu II predchádza TATA sekvencia a viaceré potenciálne väzbové miesta pre transkripčné faktory. Lokalizáciu funkčne dôležitých častí v regulačnej oblasti sledovali Lowenstein a spol. (28) pomocou mutácií na 5'-konci génu v protismere od štruktúrnych sekvencií génu pre NO-syntázu II. Stupeň expzie izoformy II závisel od dvoch regulačných oblastí v protismere od predpokladanej TATA-sekvencie. Prvá oblasť (v pozícii -48 až -209) závisela od prítomnosti LPS, čo naznačuje, že reguluje lipopolysacharidmi indukovanú expresiu NO-syntázy

II. Väzba interferónu gama k druhej oblasti (v pozícii -913 až -1029) zosilňovala indukciu izoformy II pomocou LPS, hoci interferón gama sám nezvyšoval aktivitu NO-syntázy II. Kleinert a spol. (29) ukázali, že glukokortikoidy blokujú transkripciu izoformy II pravdepodobne tak, že bránia väzbe transkripčných faktorov na gén pre NO-syntázu II. Tí istí autori identifikovali v géne izoformy II z ľudských makrofágoch sekvenciu GAGACC, ktorá v géne ľudskej endotelovej izoformy III zodpovedá za začatie transkripcie po zvýšení strihového napätia (shear stress) v cieve. Funkčný význam GAGACC sekvencie v NO-syntáze II zatiaľ nie je známy.

Park a spol. (30) zistili, že samotný NO môže na princípe inhibície spätnou väzbou inhibovať transkripciu NO-syntázy II. Posttranskripčne je mRNA NO-syntázy II stabilizovaná LPS (31). Naopak, expresia a stabilita mRNA pre NO-syntázu II je znížená glukokortikoidmi, molekulový mechanizmus tejto inhibície však zatiaľ nie je známy (29).

Fyziologické funkcie izoformy II

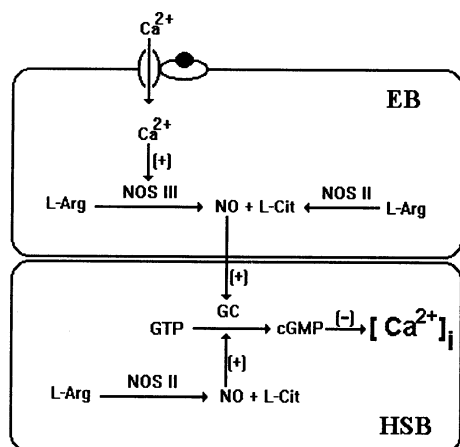
NO produkovaný makrofágovou NO-syntázou sa uplatňuje predovšetkým v nešpecifických imunitných odpovediach. V dôsledku svojich paramagnetických vlastností môže NO reagovať so železom, ktoré je koordinačne viazané v mnohých životne dôležitých enzýmoch. NO inhibuje rýchlosť limitujúci enzým v replikácii DNA — ribonukleotidreduktázu, čo vedie k zníženiu dostupnosti ribonukleotidov, ktoré sú nasledne využívané pre syntézu DNA (32). Ďalej NO inhibuje komplexy I a II mitochondriového elektrónového transportu a akonitázu v Krebsovom cykle (33), dôsledkom čoho môže byť znížená syntéza ústredného donora energie — ATP. Okrem toho, NO vo vysokej koncentrácii môže priamo interferovať s dusíkatými bázami DNA v cieľových bunkách, čo vedie k fragmentácii DNA (34). Kombinácia týchto efektov NO predstavuje pravdepodobne základný cytotoxický a cytostatický účinok NO uplatňujúci sa v ochrane hlavne pred parazitickými fungami, protozoami, mykobaktériami a tumorovými bunkami (35).

Izoforma II v patofyziológii

Po jednorazovej indukčii makrofágoch LPS alebo cytokínmi NO-syntáza II produkuje tisícnásobne viac NO než izoformy I a III. Nadmerná produkcia NO izoformou II môže byť toxická nielen pre nežiaduce mikroorganizmy a tumorové bunky, ale aj pre zdravé bunky, čo môže byť príčinou vzniku vážnych patologických zmien. Nadbytkom NO sú charakterizované viaceré zápalové a autoimunitné ochorenia. Príkladom zápalového poškodenia zdravého tkaniva je lýza buniek pankreatických ostrovcikov aktivovaných makrofágmi. Analógy L-Arg inhibujúce NO-syntázu II v tomto prípade chránia zdravé bunky pred poškodením (36).

Je zaujímavé, že izoforma II môže byť indukovaná aj v iných bunkách. Cytokínmi aktivované endotelové bunky môžu lyzovať tumorové bunky (37) a indukované hepatocyty využívajú NO na ničenie sporozoi malárie (38).

Indukčívna NO-syntáza II má významnú úlohu v septickom šoku, pre ktorý je charakteristická masívna vazodilatácia arteriál a následná hypotenzia. Mechanizmus, ktorým endotoxémia spôsobuje vazodilatáciu nie je úplne jasný, nakoľko sú v ňom zahrnuté mnohé mediátory vrátane tromboxánu A_2 , doštičkového aktivačného faktora, prostanooidov a cytokínov. Novšie experimenty naznačujú, že endotoxín samotný alebo v kombinácii s cytokínmi



Obr. 3. Mechanizmus vazodilatácie. Po aktivácii príslušného receptora vteká do endotelovej bunky (EB) vápnik, ktorý aktivuje izoformu III NO-syntázy (NOS III). NO difunduje do cievnych hladkých svalových buniek (HSB), v ktorých aktivuje guanylátyckláz (GC). Zvýšenie koncentrácie cGMP vedie v hladkých svalových bunkách k zníženiu vnútrobunkovej koncentrácie vápnika $[Ca^{2+}]_i$, a následne k vazodilatácii. V endotelových a hladkých svalových bunkách môže byť NO produkovaný aj izoformou II NO-syntázy.

Fig. 3. Mechanism of vasorelaxation. The activation of appropriate receptor leads to influx of Ca^{2+} into endothelial cell (EB) where isoform III of NO synthase (NOS III) is activated. Produced NO can diffuse to vascular smooth muscle cells (HSB) and activates guanylate cyclase (GC). Elevation of cGMP is followed by decrease of intracellular Ca^{2+} concentration $[Ca^{2+}]_i$, and results in vasorelaxation. In endothelial cells and vascular smooth muscle cells, NO can be produced also by NO-synthase II.

indukuje NO-syntázu II hlavne v cievnych hladkých svalových bunkách (HSB). Štúdie na pacientoch v konečnom štádiu septického šoku ukázali, že inhibitory N^G-monometyl-L-arginín a N^G-nitro-L-argininmetyléster môžu stabilizovať krvný tlak počas septického šoku (39), a tým zachrániť pacientovi život.

S nadprodukciou NO sú spojené aj ďalšie autoimunitné ochorenia, napríklad reumatoidná artritída, systémová erytématóza, niektoré formy glomerulonefritídy a viaceré formy vaskulitíd (40).

Izoforma III

Biochemické vlastnosti izoformy III

V poradí tretia izoforma NO-syntázy bola identifikovaná v endotelových bunkách (41). V literatúre býva označovaná EC-NOS (z anglického endothelial cell nitric oxide synthase) alebo c-NOS (z anglického constitutive nitric oxide synthase). Označenie cNOS však nevystihuje rozdiel od izoformy I, ktorá je tiež konštitutívna.

Izoformu III purifikovali Pollock a spol. (5) z endotelových buniek hovädzej aorty. NO-syntáza III je viazaná na membrány Golgiho aparátu (42). M_r izoformy III zistená elektroforézou v denaturačných podmienkach je 135 kDa. Sessa a spol. (43) a Nishida a spol. (44) získali cDNA kódujúcu izoformu III z EB hovädzej aorty. Marsden a spol. (45) pripravili cDNA z ľudských aortových endotelových buniek. V oboch prípadoch uvedení autori zistili M_r izoformy III 133 kDa (tab. 4).

Aminokyselinové sekvencie hovädzej a ľudskej NO-syntázy III sú na 94 % identické a vykazujú konsenzus motív (MGNLKS[V[G alebo A]Q) pre naviazanie kyseliny myristovej na N-koniec proteínu izoformy III (45). Naviazanie kyseliny myristovej na N-koncový glycín-2 je nevyhnutné pre naviazanie izoformy III na membrány Golgiho aparátu (42). Jediná substitúcia aminokyseliny glycín-2 za alanín priamou bodovou mutáciou v akceptorovom mieste pre kyselinu myristovú spôsobí zmenu izoformy III na cytoplazmový enzým (46). Porovnanie K_m pre L-Arg natívnej a mutovanej NO-syntázy III, ktorá bola v oboch prípadoch v rozsahu 2–4 μmol/l ukázalo, že mutácia neovplyvnila funkciu enzýmu.

Gén pre ľudskú endotelovú NO-syntázu je v haploidnom genome prítomný v jednej kópii a je lokalizovaný na chromozóme 7 (47).

Regulácia aktivity izoformy III

NO-syntáza III je rovnako ako izoforma I konštitutívne expriovaná a regulovaná Ca^{2+} (v rozsahu 100 až 500 nmol/l) a kalmodulinom (5). Prietok krvi cievou spôsobuje na povrchu endotelu strihové napätie, ktoré nielen aktivuje NO-syntázu III, ale aj zvyšuje jej expresiu (25). Marsden a spol. (48) opísali v promotórovej oblasti génu izoformy III sekvencie odpovedajúce na strihové napätie. Expresia izoformy III môže byť zvýšená aj estrogénmi (25). Suschek a spol. (49) ukázali, že vysoká hladina glukózy zvyšuje expresiu izoformy III v EB z kapilár pankreatických ostrovcov potkana. Molekulový mechanizmus, ktorým estrogény a glukóza regulujú expresiu NO-syntázy III, zatiaľ nie je známy.

Fyziologické funkcie izoformy III

Cievny endotel produkuje NO za účasti NO-syntázy III za bazálnych podmienok. NO dilatuje všetky typy ciev tak, že prechádza z EB do HSB jednoduchou difúziou alebo pomocou zatiaľ nie presne známeho transportného systému. V HSB sa NO viaže na železo hemu v cytozolovej guanylátyckláze, výsledkom čoho je zvýšenie koncentrácie cGMP v cievnych HSB (50). Zvýšená hladina cGMP vedie k zníženiu vnútrobunkovej koncentrácie Ca^{2+} a následnej relaxácii cievi (obr. 3). NO produkovaný endotelovými bunkami spolu s NO produkovaným nitergickými nervami predstavuje hlavný endogénny vazodilatačný systém, ktorý pôsobí proti vazokonstrikcii vyvolanej sympatikovým nervovým systémom a renínovo-angiotenzínovým systémom. Inhibícia NO syntézy analógmi L-arginínu spôsobuje významnú periférnu vazokonstrikciu a zvyšuje krvný tlak (51, 52).

NO produkovaný izoformou III má významnú úlohu v ochrane organizmu pred aterosklerózou. NO uvoľnený smerom do lúmenu cievy inhibuje agregáciu trombocytov a ich adhéziu na cievnu stenu (53). Rovnako NO inhibuje adhéziu leukocytov na endotelovú monovrstvu, a tým chráni pred možným vývojom včasných štádií aterosklerózy (54). NO uvoľnený z EB smerom do HSB inhibuje syntézu DNA, mitogénu a proliferáciu cievnych HSB (55), čím chráni HSB aj pred neskorými štádiami aterosklerózy. Okrem toho NO inhibuje adhéziu trombocytov (54) na HSB v miestach poškodeného endotelu. Tým chráni HSB pred účinkom trombocytových rastových faktorov, následnou proliferáciou HSB a tvorbou fibrotických plakov v neskorších štádiách aterosklerózy. Kombinácia týchto efektov endotelového NO predstavuje „antiaterosklerotický princíp“ (40).

Izoforma III v patofyziológii

Zmeny v produkcii NO izoformou III v EB sú príčinou viacerých patologických stavov. Zníženie tvorby NO v EB vedie k zhoršeniu relaxácie závislej od endotelu a hyperkontraktilite ciev (56). Dôsledkom uvedených zmien je vzostup krvného tlaku a postupný vývin hypertenzie. Dlhodobá NO deficitná hypertenzia vedie, okrem iného, k hypertrofii a fibróze myokardu (57).

Zníženie tvorby NO v EB môže byť predispozíciou k vývinu aterosklerózy tým, že sú eliminované protektívne účinky NO tak, ako sú opísané vyššie. Aterosklerotický proces môže byť navyše umocnený zvýšenou koncentráciou superoxidového radikálu, ktorý môže oxidovať nízkodenzitné lipopolyproteíny (LDL). Chronické vystavenie endotelu oxidovaným LDL spôsobuje poškodenie endotelu a ireverzibilnú inhibíciu cievnej relaxácie závislej od NO (58).

Porucha endotelu v smere porušenia rovnováhy medzi vazodilatačnými a vazokonstrikčnými faktormi spúšťa kaskádu metabolických zmien, ktoré majú dôležitú úlohu v patogenéze kardiovaskulárnych ochorení.

Záver

Eným NO-syntáza bol zistený v mnohých tkanivách a typoch buniek. Z doposiaľ známych skutočností vyplýva, že zmeny v produkcii NO v tkanivách môžu byť príčinou viacerých ochorení, ako sú hypertenzia, ateroskleróza, neurodegeneratívne ochorenia, septický šok, niektoré nádorové ochorenia, diabetes a iné.

V prípade nedostatočnej tvorby NO možno zvýšiť hladinu NO buď inhaláciou plyného NO, buď podávaním farmák, ktoré spontánne uvoľňujú NO.

V súčasnosti už existuje dostatok údajov o využívaní inhalácie nízkych dávok NO pri pulmonálnej hypertenzii na selektívnu redukciiu pulmonálneho tlaku (59). Okrem toho, látky spontánne uvoľňujúce NO, ako sú nitroglycerín a nitroprusid sodný, sa využívajú na dosiahnutie vazodilácie koronárneho riečiska už po mnohých desiatročiach. Ďalšie látky, uvoľňujúce NO špecificky v konkrétnych orgánoch, sú v súčasnosti vo vývoji. Cieľom týchto experimentov je nájsť také zlúčeniny, ktoré by v nízkych dávkach efektívne potencovali vazodiláciu, bránili adhézii trombocytov a neutrofilov či bránili rastu nádorových buniek alebo mikroorganizmov.

Ďalšou možnosťou ako zvýšiť hladinu NO je zvýšenie endogénnej produkcie NO. Keďže jednotlivé izoformy NO-syntázy sa líšia vo svojich požiadavkách na koncentráciu substrátu a dostupnosť kofaktorov, môže byť táto skutočnosť v budúcnosti využitá na terapiu ochorení spôsobených odlišnými izoformami NO-syntázy.

Na druhej strane, nadmerná produkcia NO môže byť znížená použitím inhibítorov NO-syntázy. V súčasnosti existujú relatívne selektívne inhibítory pre všetky tri izoformy NO-syntázy. Inhibítory NO-syntázy už boli s úspechom použité na zvýšenie tlaku pri hypotenzii počas septického šoku. Avšak širšie zavedenie inhibítorov NO-syntázy do klinickej praxe vyžaduje ďalšie experimenty a rozsiahle klinické skúšky.

Správna produkcia NO v jednotlivých tkanivách je teda nevyhnutná pre zachovanie normálnych funkcií jednotlivých systémov a orgánov. Zmeny v syntéze NO môžu byť príčinou viacerých patologických procesov. Selektívne ovplyvnenie hladiny NO, či už

donormi NO alebo inhibítormi NO-syntázy, otvára do budúcnosti široké možnosti liečby ochorení spôsobených poruchou produkcie NO.

Literatúra

- Bredt D.S., Snyder S.H.:** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, s. 682—685.
- Schmidt H.H.H.W., Pollock J.S., Nakane M., Gorsky L.D., Forstermann U., Murad F.:** Purification of a soluble isoform of guanylyl-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 682—685.
- Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Weise M.F., Nathan C.F.:** Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 7773—7777.
- Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A.:** Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase: identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.*, 266, 1991, s. 22789—22791.
- Yui Y., Hattori R., Kosuga K., Eizawa H., Hiki K., Kawai C.:** Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J. Biol. Chem.*, 266, 1991, s. 12544—12547.
- Pollock J.S., Forstermann U., Mitchell J.A., Warner E.R., Schmidt H.H.H.W., Nakane M., Murad F.:** Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 10480—10484.
- Forstermann U., Schmidt H.H.H.W., Pollock J.S., Sheng H., Mitchell A.J., Warner T.D., Nakane M., Murad F.:** Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.*, 42, 1991, s. 1849—1857.
- McMillan K., Bredt D.S., Hirsch D.J., Snyder S.H., Clark J.E., Masters B.S.:** Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 11141—11145.
- Mayer B.:** Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthases. S. 21—42. In: *Nitric oxide in nervous system*. Academic Press Ltd. 1995.
- Knowles R.G., Moncada S.:** Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem. J.*, 298, 1994, s. 249—258.
- Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H.:** Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351, 1991, s. 714—718.
- Nakane M., Schmidt H.H., Pollock J.S., Forstermann U., Murad F.:** Cloned human brain nitric oxide synthase in highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 316, 1993, s. 175—180.
- Xu W.M., Gorman P., Sheer D., Bates G., Kishimoto J., Lizhi J., Emson P.:** Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1) to 12q24.2-24.31 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 64, 1993, s. 62—63.
- Weiner C.P., Lizasoain I., Baylis S.A., Knowles R.G., Charles I.G., Moncada S.:** Induction of calcium-dependent nitric oxide synthase by sex hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994, s. 5212—5216.
- Marsden P.A., Heng H.H.Q., Duff C.L., Shi X.M., Tsui L.C., Hall A.V.:** Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17Q11.2-Q12. *Genomics*, 19, 1994, s. 183—185.

- 16. Nakane M., Mitchell J., Forstermann U., Murad F.:** Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180, 1991, s. 1396–1402.
- 17. Egberongbe Y.I., Gentleman S.M., Falkai P., Bogerts B., Polak J.M., Roberts G.W.:** The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience*, 59, 1994, s. 561–578.
- 18. Matsumoto T., Nakane M., Pollock J.S., Kuk J.E., Forstermann U.:** A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci. Lett.*, 155, 1993, s. 61–64.
- 19. Garthwaite J.:** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 14, 1991, s. 60–67.
- 20. Bohme G.A., Bon C., Stutzmann J.M., Doble A., Blanchard J.C.:** Possible involvement of nitric oxide in long term potentiation. *Europ. J. Pharmacol.*, 199, 1991, s. 379–381.
- 21. Sakuma I., Togashi H., Yoshioka M., Saito H., Yanagida M., Tamura M., Kobayashi T., Yasuda H., Gross S.S., Levi R.:** NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo: a role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circulat. Res.*, 70, 1992, s. 607–611.
- 22. Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M.J., Moncada S.:** Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylat cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1989, s. 5159–5162.
- 23. Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D., Brecht D.S., Snyder S.H.:** Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Sci. USA*, 88, 1991, s. 6368–6371.
- 24. Nowicki J.P., Duval D., Poinet H., Scatton B.:** Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Europ. J. Pharmacol.*, 204, 1991, s. 339–340.
- 25. Forstermann U., Kleinert H.:** Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 352, 1995, s. 351–364.
- 26. Xie Q.W., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., Nathan C.:** Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, 256, 1992, s. 225–228.
- 27. Cho H.J., Xie Q.W., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Nathan C.:** Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.*, 176, 1992, s. 599–604.
- 28. Lowenstein C.J., Allez E.W., Raval P., Snowman A.M., Snyder S.H., Russell S.W., Murphy W.J.:** Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993, s. 9730–9734.
- 29. Kleinert H., Euchenhoffer C., Ihring-Biedert I., Forstermann U.:** Glucocorticoids inhibit the induction of NO synthase II (iNOS) by downregulating cytokine-induced activity of transcription factor NF- κ B. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1995, Suppl. 351, s. R76.
- 30. Park S.K., Lin H.L., Murphy S.:** Nitric oxide limits transcriptional induction of nitric oxide synthase in CNS glial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201, 1994, s. 762–768.
- 31. Weisz A., Oguchi S., Cicatiello L., Esumi H.:** Dual mechanism for the control of inducible type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide — transcriptional and post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, 269, 1994, s. 8324–8333.
- 32. Lepoivre M., Fiesch F., Coves J., Thelander L., Fontecave M.:** Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 1991, s. 442–448.
- 33. Nathan C.F., Hibbs J.B.:** Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, 3, 1991, s. 65–70.
- 34. Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M., Elespuru R.K., Misra M., Dumas T.M., Cebula T.A., Koch W.T., Andrews A.W., Allen J.S., Keefer J.K.:** DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Diabet. Sci.*, 254, 1991, s. 1001–1003.
- 35. Kerwin J.F., Heller M.:** The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs. *Med. Res. Rev.*, 14, 1994, s. 23–74.
- 36. Fehsel K., Jalowy A., Qi S., Burkart V., Hartmann B., Kolb H.:** Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes*, 42, 1993, s. 496–500.
- 37. Li L.M., Kilbourn R.G., Adams J., Fidler I.J.:** Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cell. *Cancer Res.*, 51, 1991, s. 2531–2535.
- 38. Green S.J., Mellouk S., Hoffman S.L., Meltzer M.S., Nacy C.A.:** Cellular mechanism of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol Lett.*, 25, 1990, s. 15–19.
- 39. Petros A., Bennett D., Vallance P.:** Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*, 338, 1991, s. 1557–1558.
- 40. Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H.:** Nitric oxide synthase isozymes: Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23, 1994, Part 2, s. 1121–1131.
- 41. Forstermann U., Pollock J.S., Schmidt H.H., Heller M., Murad F.:** Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 1788–1792.
- 42. Sessa W.C., Garcia-Cardena G., Liu J., Keh A., Pollock J.S., Bradley J., Thiru S., Braverman I.M., Desai K.M.:** The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 270, 1995, s. 7641–7644.
- 43. Sessa W.C., Harrison J.K., Barber C.M., Zeng D., Durieux M.E., D'Angelo D.D., Lynch K.R., Peach M.J.:** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 267, 1992, s. 15274–15276.
- 44. Nishida K., Harrison D.G., Navas J.P., Fisher A.A., Dockery S.P., Uematsu M., Nerem R.M., Alexander R.W., Murphy T.J.:** Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.*, 90, 1992, s. 2092–2096.
- 45. Marsden P.A., Schappert K.T., Chen H.S., Flowers M., Sundell C.L., Wilcox J.N., Lamas S., Michel T.:** Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.*, 307, 1992, s. 287–293.
- 46. Sessa W.C., Barber C.M., Lynch K.R.:** Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circulat. Res.*, 72, 1993, s. 921–924.

47. Xu W., Charles I., Moncada S., Gorman P., Liu L., Emson P.: Chromosomal assignment of the inducible NOS gene and endothelial NOS gene to human chromosome 17p11-17q11 and chromosome 7, respectively. *Endothelium*, 1, 1993, Suppl., s. 24.
48. Marsden P.A., Heng H.H.Q., Scherer S.W., Stewart R.J., Hall A.V., Shi X.M., Tsui L.C., Schappert K.T.: Structure and chromosomal localisation of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.*, 268, 1993, s. 17478—17488.
49. Suschek C., Fehsel K., Kroncke K.D., Sommer A.V.K.B.: Primary cultures of rat islet capillary endothelial cell. Constitutive and cytokine-inducible macrophage-like nitric oxide synthases are expressed and activities regulated by glucose concentration. *Amer. J. Pathol.*, 145, 1994, s. 685—695.
50. Forstermann U., Mulsch A., Bohme E., Busse R.: Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circulat. Res.*, 58, 1986, s. 531—538.
51. Rees D.D., Palmer R.M.J., Moncada S.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1989, s. 3375—3378.
52. Bernátová I., Pecháňová O., Šimko F.: Captopril prevents NO-deficient hypertension and left ventricular hypertrophy development without affecting NO synthase activity in rats. *Physiol. Res.*, 45, 1996, s. 311—316.
53. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2, 1987, s. 1057—1058.
54. Kubes P., Suzuki M., Granger D.N.: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 651—655.
55. Nakaki T., Nakayama M., Kato R.: Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Europ. J. Pharmacol.*, 189, 1990, s. 347—353.
56. Holécýová A., Trk J., Bernátová I., Pecháňová O.: Restriction of nitric oxide rather than elevated blood pressure is responsible for alterations of vascular responses in nitric oxide deficient hypertension. *Physiol. Res.*, 45, 1996, s. 317—321.
57. Babál P., Pecháňová O., Bernátová I., Štvrtina S.: Chronic inhibition of NO synthesis produces myocardial fibrosis and arterial media hyperplasia. *Histol. Histopathol.*, 12, 1997, s. 623—629.
58. Flavahan N.A.: Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. *Circulation*, 85, 1992, s. 1927—1938.
59. Adnot S., Raffestin B.: Pulmonary hypertension: NO therapy? *Thorax*, 51, 1996, s. 762—764.
60. Ursell P.C., Mayes M.: Anatomic distribution of nitric oxide synthase in the heart. *Int. J. Cardiol.*, 50, 1995, s. 217—223.
61. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, s. 10143—10047.
62. Mayer B., John M., Bohme E.: Purification of Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum; cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.*, 277, 1990, s. 215—219.
63. Dinerman J.L., Dawson T.M., Schell M.J., Snowman A., Snyder S.H.: Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994, s. 4214—4218.
64. Dun N.L., Dun S.L., Forstermann U., Tseng L.F.: Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 147, 1992, s. 217—220.
65. Schmidt H.H.H.W., Gagne G.D., Nakane M., Pollock J.S., Miller M.F., Murad F.: Mapping of neuronal nitric oxide synthase in the rat suggest frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrergic signal transduction. *J. Histochem. Cytochem.*, 40, 1992, s. 1439—1456.
66. Schulz R., Nava E., Moncada S.: Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Brit. J. Pharmacol.*, 105, 1992, s. 575—580.
67. Brady A.J.B., Poole-Wilson P.A., Harding S.E., Warren J.B.: Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Amer. J. Physiol.*, 263, 1992, s. H1963—H1966.
68. Busse R., Mulsch A.: Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, 275, 1990, s. 87—90.
69. Beasley D., Schwatz J.H., Brenner B.M.: Interleukin-1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 87, 1991, s. 602—608.
70. Asdorff K., Kolb-Bachofen V.: RNA in situ hybridization for detection of inducible nitric oxide synthase in rat and human monocytes. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*, 374, 1993, s. 693.
71. De Maria R., Cifone M.G., Trotta R., Rippo M.R., Festucia C., Santoni A., Testi R.: Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the NKC family of signal transducing receptors. *J. Exp. Med.*, 180, 1994, s. 1999—2004.
72. McCall T., Palmer R.M.J., Moncada S.: Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexametason. *Europ. J. Immunol.*, 21, 1991, s. 2523—2527.
73. Malawista S.E., Montgomery R.R., van Blaricom G.: Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of ataphilococci by human neutrophil cytotoblasts. *J. Clin. Invest.*, 90, 1992, s. 631—636.
74. Minc-Golomb D., Tsarfaty I., Schwartz J.P.: Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin and cytokine. *Brit. J. Pharmacol.*, 112, 1994, s. 720—722.
75. Lee S.C., Dickson D.W., Liu W., Brosman C.W.: Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 and interferon gamma. *J. Neuroimmunol.*, 46, 1993, s. 19—24.
76. Hewett S.J., Corbett J.A., McDaniel M.L., Choi D.V.: Interferon-gama and interleukin-1 induce nitric oxide formation from primary mouse astrocytes. *Neurosci. Lett.*, 164, 1991, s. 229—232.
77. Palmer R.M.J., Hickery M.S., Charles I.G., Moncada S., Bayliss M.T.: Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193, 1993, s. 398—405.
78. Curran R.D., Billiar T.R., Stuehr D.J., Hofmann K., Simmons R.L.: Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J. Exp. Med.*, 170, 1989, s. 1769—1774.
79. Nussler A.K., Di Silvio, Billiar T.R., Hoffman R.A., Geller D.A., Selby R., Madariaga J., Simmons R.L.: Simulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytolines and endotoxin. *J. Exp. Med.*, 176, 1992, s. 261—264.

- 80. Billiar T.R., Curran R.D., Stuehr D.J., West M.A., Bentz B.G., Simmons R.L.:** An L-arginine dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J. Exp. Med.*, 169, 1989, s. 1467–1472.
- 81. Corbett J.A., Kwon G., Misko T.P., Rodi C.P., McDaniels M.L.:** Tyrosine kinase involvement in IL-1-induced expression of iNOS by -cells purified from islets of Langerhans. *Amer. J. Physiol.*, 267, 1994, s. C48–C54.
- 82. Markewitz H.A., Michael J.R., Kohan D.E.:** Citokine-induced expression of nitric oxide synthase in rat renal tubule cells. *J. Clin. Invest.*, 91, 1993, s. 2138–2143.
- 83. Robbins R.A., Springall D.R., Warren J.B., Kwon O.J., Buttery L.D.K., Wilson A.J., Adcock I.M., Riveros-Moreno V., Moncada S., Polak J., Barnes P.J.:** Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 198, 1994, s. 835–843.
- 84. Adcock I.M., Brown C.R., Kwon O., Barnes P.J.:** Oxidative stress induces NFkB DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 1994, s. 518–524.
- 85. Jorens P.G., van Overveld F.J., Bult H., Vermeire P.A., Herman A.G.:** Synergism between interleukin-1 and interferon gamma, an inducer of nitric oxide synthase, in rat lung fibroblasts. *Europ. J. Pharmacol.*, 200, 1993, s. 205–209.
- 86. Kolb-Bachofen V., Fehsel K., Michel G., Ruzicka T.:** Epidermal keratinocytes expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesion of psoriasis vulgaris. *Lancet*, 344, 1994, s. 139.
- 87. Werner-Felmayer G., Golderer G., Werner E.R., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Wachter H.:** Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 172, 1990, s. 1599–1607.
- 88. Ellmann C., Corbett J.A., Misko T.P., McDaniel M., Beckerman K.P.:** Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in the rat ovary. A potential role of nitric oxide in the ovulatory process. *J. Clin. Invest.*, 92, 1993, s. 3053–3056.
- 89. Lyons C.R., Orloff G.J., Cunningham J.M.:** Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.*, 267, 1992, s. 6370–6374.
- 90. Nunokawa Y., Ishida N., Takana S.:** Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 1993, s. 89–94.
- 91. Wood E.R., Berger H.J., Sherman P.A., Lapetina E.G.:** Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 1993, s. 767–774.
- 92. Geller D.A., Lowenstein C.J., Shapiro R.A., Nussler A.K., Di S.M., Wang S.C., Nakayama D.K., Simmons R.L., Snyder S.H., Billiar T.R.:** Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993, s. 3491–3495.
- 93. Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., Michel T.:** Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 6348–6352.
- 94. Janssens S.P., Shimouchi A., Quertermous T., Bloch D.B., Bloch K.D.:** Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 267, 1992, s. 14159–14522.

Do redakcie došlo 22.5.1997.

PREDSTAVUJEME NOVÉ KNIHY

Wiebers D.O., Dale A.J.D., Kokmen E., Swanson J.W. (Eds.): Mayo Clinic Examinations in Neurology.

7. vydanie. St. Louis—Baltimore—Boston—Carlsbad—Chicago—Minneapolis—New York—Philadelphia—Portland—London—Milan—Sydney—Tokyo—Toronto, Mosby 1998, tabulky a čiernobiele obrázky, 528 strán.

Pokrok v oblasti poznania v medicíne za posledné roky sa prejavuje vo všetkých vedných disciplínach. Významnou mierou zasiahol aj do neurológie. Nové poznatky ovplyvňujú nielen diagnosticko-laboratórnu časť, ale aj klinickú liečebnú časť. Ide pritom nielen o vývoj nových efektívnejších vyšetrovacích metód, ale aj nové možnosti využitia už používaných techník.

Predstavovaná kniha vychádza v 7. prepracovanom a doplnenom vydaní, aby v zhustenej forme autori priniesli čitateľovi najnovšie teoretické a klinické poznatky o nových možnostiach neurologických vyšetrovacích prístupov v známej forme obľúbenej učebnice.

V prvej časti knihy sa autori venujú anamnéze a jej interpretácii. V ďalších kapitolách je to neurologická propedeutika (2), mentálne funkcie (3), reč a motorické poruchy (4), hlavové nervy (5), neurooftalmológia (6), motorické funkcie - centrálné (7) a periférne (8), reflexy (9), vyšetrenie senzoričných funkcií (10), auto-

nómne funkcie (11), klinické vyšetrenia pri vybraných neurologických problémoch (12), vyšetrenie detí (13).

V rámci diagnostických prístupov (14) sa podrobnejšie opisujú neurorádiologické prístupy (rtg, myelografia, mozgová angiografia, CT, MRI, MRI angiografia, rádionuklidové zobrazovanie).

V časti "Klinická neurofyziológia" sú opísané EEG, EMG, možnosti vyšetrenia konduktivity nervov, testy somatosenzorického systému, samostatné časti sa venujú sluchovo-vestibulárnemu a zrakovému systému, vyšetrenie pri poruchách spánku, funkčné vyšetrenie autonómneho systému. V časti 16 je vyšetrenie cerebrospinálneho moku a v kapitole 17 ďalšie laboratórne možnosti pri neurologických ochoreniach.

Po formálnej stránke je kniha na vysokej estetickú a technickú úroveň, napriek tomu je zreteľná snaha autorov poskytnúť čitateľovi najnovšiu informáciu v klasickej forme už známej knihy. Pomocou tejto učebnice môžeme nahliadnuť do prostredia známej Mayo Clinic, do formy výučby a prípravy medikov i lekárov a je pre nás dôležitou vodiacou informáciou. Kniha si nájde svojich čitateľov, verím že sa dostane do všetkých knižníc neurologických, ale aj psychiatrických oddelení našich nemocníc, aby bola k dispozícii všetkým, ktorí chcú a môžu využívať technický pokrok v prospech neurologických pacientov.

M. Bernadič