

REGULATOROWA ROLA TLENKU AZOTU W APOPTOZIE*

NITRIC OXIDE AS A BIOREGULATOR OF APOPTOSIS

Małgorzata KRZYŻOWSKA

Pracownia Immunologii, Zakład Wirusologii, Mykologii i Immunologii,
Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW

Streszczenie: Tlenek azotu (NO) syntetyzowany z L-argininy przez syntazy tlenku azotu jest silnie dyfundującym i reaktywnym związkiem odgrywającym dużą rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Jeden z tych procesów, apoptoza, odgrywa istotną rolę w przebiegu prawidłowego rozwoju embrionalnego oraz utrzymaniu homeostazy organizmów wielokomórkowych. W niektórych komórkach NO może sprzyjać indukcji apoptozy (efekt pro-apoptotyczny), zaś w innych może hamować apoptozę (efekt anty-apoptotyczny). Efekt końcowy NO zależy od stopnia produkcji związku oraz jego oddziaływania z innymi cząsteczkami, takimi jak: tiole, reaktywne formy tlenu i białka. Długotrwała produkcja NO działa jako czynnik indukujący apoptozę przez uwalnianie cytochromu c z mitochondriów i aktywacji kaspaz, wzrostu ekspresji białka p53, aktywacji kinaz aktywowanych stresem (JNK/SAPK) oraz spadku ekspresji anty-apoptotycznego białka bcl-2. W niskim bądź fizjologicznym stężeniu NO chroni przed apoptozą poprzez uruchomienie szlaków zależnych od cyklicznego guanozyno-5'-monofosforanu (cGMP), wiążących się z aktywacją m.in. kinazy białkowej G (PKG), wzrostem ekspresji anty-apoptotycznych białek bcl-2 i hsp 70 oraz poprzez bezpośrednią S-nitrozylację enzymów efektorowych apoptozy – kaspaz. W niniejszej pracy przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący pro- i antyapoptotycznego działania NO.

Słowa kluczowe: apoptoza, tlenek azotu (NO), anion nadazotynowy, cGMP, S-nitrozylacja, kaspazy, bcl-2.

Summary: Nitric oxide (NO), synthesized from L-arginine by NO synthases, is a small, diffusible, highly reactive molecule with dichotomous regulatory roles under physiological and pathological conditions. Apoptosis plays an important role in the development of the organism but also under various pathological conditions. NO can exert both pro- and anti-apoptotic effects, depending on the conditions and cell type. Long-lasting production of NO acts as a proapoptotic modulator by activating caspase family proteases through the release of mitochondrial cytochrome c into the cytosol, upregulation of p53 expression, activation of JNK/SAPK, and altering the expression of apoptosis-associated proteins including Bcl-2 family proteins. However, low or physiological concentrations of NO prevent cells from apoptosis via expression of protective genes such as heat shock proteins, Bcl-2 as well as direct inhibition of the apoptotic caspase family proteases by S-nitrosylation of the cysteine thiol. Our current

*Praca sfinansowana w ramach grantu KBN nr 3 P04A 022 25

understanding of the mechanisms by which NO influences both pro- and antiapoptotic actions is discussed in this review.

Key words: apoptosis, nitric oxide (NO), peroxynitrite, cGMP, S-nitrosylation, caspase, bcl-2.

Wykaz zastosowanych skrótów: **AIF** (*apoptosis inducing factor*) – czynnik indukujący apoptozę, **Apaf-1** (*dATP/ATP-dependent apoptotic protease activating factor-1*) – zależny od dATP/ATP czynnik aktywujący proteazę, **A-SMase** (*acid sphingomyelinase*) – kwaśna sfingomielinaza, **CARD** (*caspase recruiting domain*) – domena rekrutująca kaspazę, **CREB** (*cAMP response element binding protein*) – białko wiążące element odpowiedzi na cAMP, **cGMP** (*cyclic guanosine monophosphate*) – cykliczny guanozyno monofosforan, **eNOS** (*endothelial nitric oxide synthase*) – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu, **ERK** (*extracellular signal-related kinase*) – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym, **HSP** (*heat shock proteins*) – białka szoku cieplnego, **IFN** – interferon, **iNOS** (*inducible nitric oxide synthase*) – indukowalna syntaza tlenku azotu, **JNK** (*c-Jun N-terminal kinase*) – N-końcowa kinaza czynnika transkrypcyjnego c-Jun, **MAPK** (*mitogen-activated protein kinase*) – kinazy kinaz kinaz białkowych aktywowanych mitogenem, **mtNOS** (*mitochondrial nitric oxide synthase*) – mitochondrialna syntaza tlenku azotu, **NADPH** – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, **nNOS** (*neuronal nitric oxide synthase*) – neuronalna syntaza tlenku azotu, **NF-κB** (*nuclear factor κB*) – czynnik transkrypcyjny κB, **NO** (*nitric oxide*) – tlenek azotu, **N-Smase** (*neutral sphingomyelinase*) – sfingomielinaza obojętna, **ODQ** (*1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one*) – 1-H-oksodiazolo-4,3-a] chinoksalino-1-on, **PARP** (*poli (ADP)ribose polymerase*) – polimeraza poli(ADP) rybozy, **PKC** (*protein kinase C*) – kinaza białkowa C, **PKG** (*protein kinase G*) – kinaza białkowa G, **RNOS** (*reactive nitric oxide species*) – reaktywne formy tlenku azotu, **ROS** (*reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu, **SAPK** (*stress-activated protein kinase*) – kinaza aktywowana stresem, **sGC** (*soluble guanyl cyclase*) – cytozolowa cyklaza guanylowa, **Smac/DIABLO** (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI*) – drugi czynnik mitochondrialny, **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu.

1. WSTĘP

Tlenek azotu (NO) jest lipofilowym i silnie dyfundującym związkiem, którego działanie zależy zarówno od stężenia, jak i postaci występowania w komórce. Stanowi on rodnik uważany za pierwotnego mediatora uszkodzeń komórek oraz tkanek w stanach chorobowych. Najnowsze badania wskazują również na jego rolę cytoprotekcyjną, ze względu na pewne właściwości antyoksydacyjne [16,35]. NO jest cząsteczką biorącą udział w bardzo wielu procesach w organizmie m.in.:

- NO stanowi parakrynnny neurotransmitter w układzie nerwowym,
- odpowiada za rozkurczanie naczyń krwionośnych i hamowanie agregacji płytek krwi,
- stanowi jeden z mechanizmów cytotoksyczności makrofagów i komórek NK w układzie odpornościowym,
- a ponadto jest jednym z najefektywniejszych związków oczyszczających komórki z wolnych rodników oraz regulujących aktywność wielu kinaz i czynników transkrypcyjnych [13,45,51].

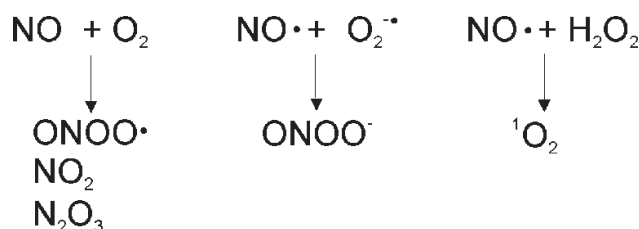
Wszystko to sprawia, że NO jest jedną z najintensywniej badanych cząsteczek, zaś w 1998 roku trzech naukowców: F. Murad, R.F. Furchgott i L.J. Ignarro otrzymało Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny za pracę nad zbadaniem ciągu przemian metabolicznych od L-argininy do NO.

2. BIOCHEMIA NO

Cząsteczka NO ma małą masę, obojętny ładunek, co w warunkach danej temperatury organizmu i stałej średniej energii kinetycznej wszystkich cząstek sprawia, że NO może szybko dyfundować w roztworach wodnych i przez spolaryzowane błony biologiczne. W stężeniach fizjologicznych (10 nM – 5 μM) czas półtrwania ($t_{1/2}$) cząsteczki NO wynosi 1–30 s. NO łatwo utlenia się w organizmie bez pomocy enzymów do azotynu NO_2^- , który następnie przechodzi w stabilny azotan NO_3^- , będący ostatecznym metabolitem NO, wydalanym z organizmu [16,35]. Aktywność biologiczna NO wiąże się z obecnością w cząsteczce NO niesparowanego elektronu, który czyni NO wolnym rodnikiem (ryc. 1). NO z tlenem lub rodnikami tlenowymi tworzy reaktywne formy tlenku azotu – RNOS (ang. *reactive NO species*). W warunkach stresu, NO może reagować z anionorodnikiem ponadtlenkowym $\text{O}_2^{\cdot -}$, co prowadzi do powstania anionu nadtlendioazotynowego ONOO^- , który w środowisku płynu tkankowego ulega natychmiastowej protonacji do kwasu nadtlendioazotowego HOONO . Cząsteczka tego kwasu może dalej ulegać hemolitycznemu rozpadowi do rodnika wodorotlenowego OH^\cdot i rodnika dwutlenku azotu (NO_2^\cdot) lub heterolitycznemu rozpadowi do kationu nitroniowego (NO_2^+) i anionu wodorotlenowego (OH^-) [2,3,15].

Kluczowym mechanizmem regulacji procesów fizjologicznych przez NO i jego pochodne jest posttranslacyjna modyfikacja białek przez nitrację lub nitrozylację. Nitracja wiąże się z przyłączeniem grupy NO_2^+ do tyrozyny lub rzadziej tryptofanu. Nitrozyłacja natomiast odnosi się do przyłączenia grupy NO^+ do metalu lub grupy tiolowej, zazwyczaj reszty cysteinowej (S-nitrozyłacja).

Klasycznym przykładem regulacji funkcji białek przez NO jest bezpośrednie wiązanie się z kationami metali obecnymi w pierścieniach hemowych enzymów, np. cyklazy guanylowej, hemoglobiny czy oksydazy cytochromu c [16,35]. W wielu komórkach NO reaguje z kationem Fe^{3+} zawartym w pierścieniu hemowym cytozolowej cyklazy guanylowej (sGC), gdzie jon żelaza jest koordynacyjnie związany z pięcioma ligandami. NO aktywuje cyklazę guanylową przez utworzenie z Fe^{3+} zawartym w pierścieniu hemowym wiązania koordynacyjnego, co wymusza zmiany w strukturze przestrzennej enzymu. W rezultacie dochodzi do powstania cGMP, który z kolei aktywuje szlaki transdukcji sygnału i fosforylacji białek. Jednak nie wszystkie mechanizmy działania NO mogą być wyjaśnione za pośrednictwem szlaku zależnego od cGMP.



RYCINA 1. Produkty reakcji NO z tlenem lub reaktywnymi formami tlenu (ROS)

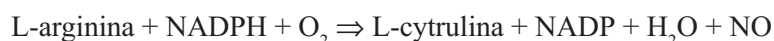
W warunkach fizjologicznych w obecności tlenu docelowymi grupami, z którymi oddziałuje NO i jego tlenowe pochodne, są grupy –SH. S-nitrozylacja stanowi ważną, posttranslacyjną modyfikację struktur białkowych wpływającą na funkcjonowanie białek. Przykłady obejmują aktywację lub zahamowanie enzymów, takich jak: Ras i kaspazy [17]. Szczegóły dotyczące inaktywacji enzymów efektorowych apoptozy – kaspaz przez S-nitrozylację zostaną podane poniżej.

Ciekawą cechą związków tioli i tlenku azotu jest ich względna stabilność, co czyni je znakomitymi związkami transportującymi i buforującymi tlenek azotu. Przykładowo, S-nitrozoalbumina stanowi 85% wszystkich nitrozotiooli osocza i ma, podobnie jak S-nitrozoglutation, zdolność do rozszerzania naczyń krwionośnych i hamowania agregacji płytek krwi. Ponadto, nitrozotiole wpływają na takie procesy fizjologiczne, jak immunostymulacja, mają właściwości bakteriobójcze i neuromodulacyjne [17, 24].

Co ciekawe, nitrozotiole znacznie wolniej reagują z anionorodnikiem nadadtlenkowym O_2^- niż wolny NO, co zmniejsza stężenie groźnego produktu tych reakcji – anionu nadadtlenoazotynowego $ONOO^-$. Niskie stężenie nadadtlenoazotynów jest więc korzystne dla całego organizmu, gdyż chroni przed uszkodzeniem białek, lipidów i DNA. Anion nadadtlenoazotynowy z łatwością nitruje reszty tyrozyny w białkach, zaś nitracja reszt tyrozyny może regulować funkcjonowanie białek poprzez zahamowanie fosforylacji tyrozyny [7]. Ponadto, anion nadadtlenoazotynowy uszkadza zasady azotowe w DNA, powodując ich utlenianie i nitrozowanie, co może być przyczyną zmian genetycznych, czyli mutacji, o ile nie zostaną one naprawione przez systemy naprawcze DNA w komórce [10].

3. SYNTAZY TLENKU AZOTU

Endogenny tlenek azotu jest produkowany w organizmie z L-argininy przez syntazę tlenku azotu (NOS) w reakcji:



Znane są 3 izoformy syntazy tlenku azotu: neuronalna (nNOS), endotelialna (eNOS) i indukowalna (iNOS) [5,14]. nNOS ulega stałej, konstytutywnej ekspresji w mózgu, ale również w komórkach mięśni szkieletowych, natomiast konstytutywną ekspresję eNOS odkryto w komórkach śródbłónki naczyniowej, ale też w wielu innych komórkach (monocytach, płytkach krwi, kardiomiocytach). Konstytutywne nNOS i eNOS ulegają stałej ekspresji, są zależne od kalmoduliny (CaM) i związanych z nią jonów wapnia ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$), a tym samym ich aktywność jest regulowana wzrostem poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) bądź to na skutek pobudzenia receptorów NMDA neuronów przez glutaminian (nNOS), bądź też w wyniku działania cyklu fosfoinozytoloowego, aktywowanego przez receptory muskarynowe stymulowane acetylocholina (eNOS). Indukowalna syntaza tlenku azotu (iNOS) ulega ekspresji głównie w makrofagach, komórkach Kupfera, hepatocytach pod wpływem bodźców

zapalnych lub stymulacji immunologicznej, a zatem nie jest obecna w wymienionych komórkach, dopóki nie zajdzie ekspresja ich genów w wyniku oddziaływania LPS-u, IFN- γ , IL-1 czy TNF- α [5,14]. Wielu autorów wskazuje również na istnienie czwartej izoformy syntazy tlenku azotu – mitochondrialnej syntazy tlenku azotu (mtNOS), chociaż jej pochodzenie i rola nie zostały do końca wyjaśnione. Wiele prac wskazuje na to, że mtNOS stanowi produkt alternatywnego składowania nNOS [19,23]. W przeciwieństwie jednak do nNOS, mtNOS podlega odmiennym modyfikacjom posttranslacyjnym: acylacji odmiennej od acylacji eNOS oraz fosforylacji na C-końcu [19]. Dzięki obecności mtNOS, zlokalizowanej w wewnętrznej błonie mitochondriów możliwa jest konstytutywna produkcja NO w mitochondriach. NO w mitochondriach stanowi regulator oddychania mitochondrialnego. Wiąże się on z oksydazą cytochromu c (kompleks IV) – ostatnim enzymem łańcucha oddechowego – i kompetytywnie hamuje go, zaś tego rodzaju inhibicja jest odwracalna [20,42,46]. Rola mitochondrialnej produkcji NO wiąże się z regulacją intensywności oddychania mitochondrialnego, zwłaszcza w odniesieniu do komórek znajdujących się daleko od naczyń włosowatych. Komórki znajdujące się najbliżej naczyń krwionośnych zazwyczaj otrzymują najwięcej O_2 oraz L-argininy, co stymuluje mtNOS oraz produkcję NO. NO z kolei oddziałując z oksydazą cytochromową zmniejsza zużycie O_2 , co pozwala na dalszą dyfuzję O_2 w tkankach [20,42,46,53].

4. APOPTOZA

Apoptoza, inaczej programowana śmierć komórki, odgrywa istotną rolę w przebiegu prawidłowego rozwoju embrionalnego, utrzymaniu homeostazy organizmów wielokomórkowych oraz jest niezbędna w regulacji procesów, takich jak selekcja negatywna auto-reaktywnych limfocytów T w grasicy, jak również usuwanie dojrzałych autoreaktywnych limfocytów T na obwodzie. Supresja procesu śmierci komórkowej może prowadzić do rozwoju nowotworów, chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych. Uruchomienie procesu apoptozy związane jest z działaniem na komórkę czynników uszkodzających i niemożnością naprawy powstałych uszkodzeń. Komórki podlegające apoptozie wykazują szereg charakterystycznych zmian morfologicznych, w tym pączkowanie błony komórkowej, zmniejszenie objętości komórki, kondensację jądra komórkowego oraz tworzenie się, związanych z błoną komórkową, ciałek apoptotycznych, które są szybko pochłaniane i fagocytowane przez sąsiadujące, zdrowe komórki. Zapobiega to uwolnieniu zawartości komórki i rozwojowi zapalenia [43,47]. Aktywnej, wymagającej energii śmierci komórkowej towarzyszy również fragmentacja DNA, proteoliza białek komórkowych, spadek transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) oraz zaburzenia asymetrii błony komórkowej [43].

Molekularny mechanizm apoptozy zależny jest od stałej obecności w komórce białek zdolnych do inicjacji i transdukcji sygnału śmierci, jak również białek bezpośrednio biorących udział w fazie wykonawczej PCD. Czynniki inicjujące działanie maszynierii śmierci komórkowej można podzielić na trzy grupy:

- (1) prowadzące do aktywacji tzw. receptorów śmierci,
- (2) stanowiące zawartość granulosomów komórek cytotoksycznych oraz
- (3) uszkadzające bezpośrednio lub będące pośrednim źródłem stresu komórkowego, jak np. związki cytotoksyczne czy też promieniowanie jonizujące lub ultrafioletowe [43, 47].

5. NO JAKO CZYNNIK INDUKUJĄCY APOPTOZĘ

Apoptoza indukowana NO odgrywa ważną rolę w dwóch rodzajach procesów:

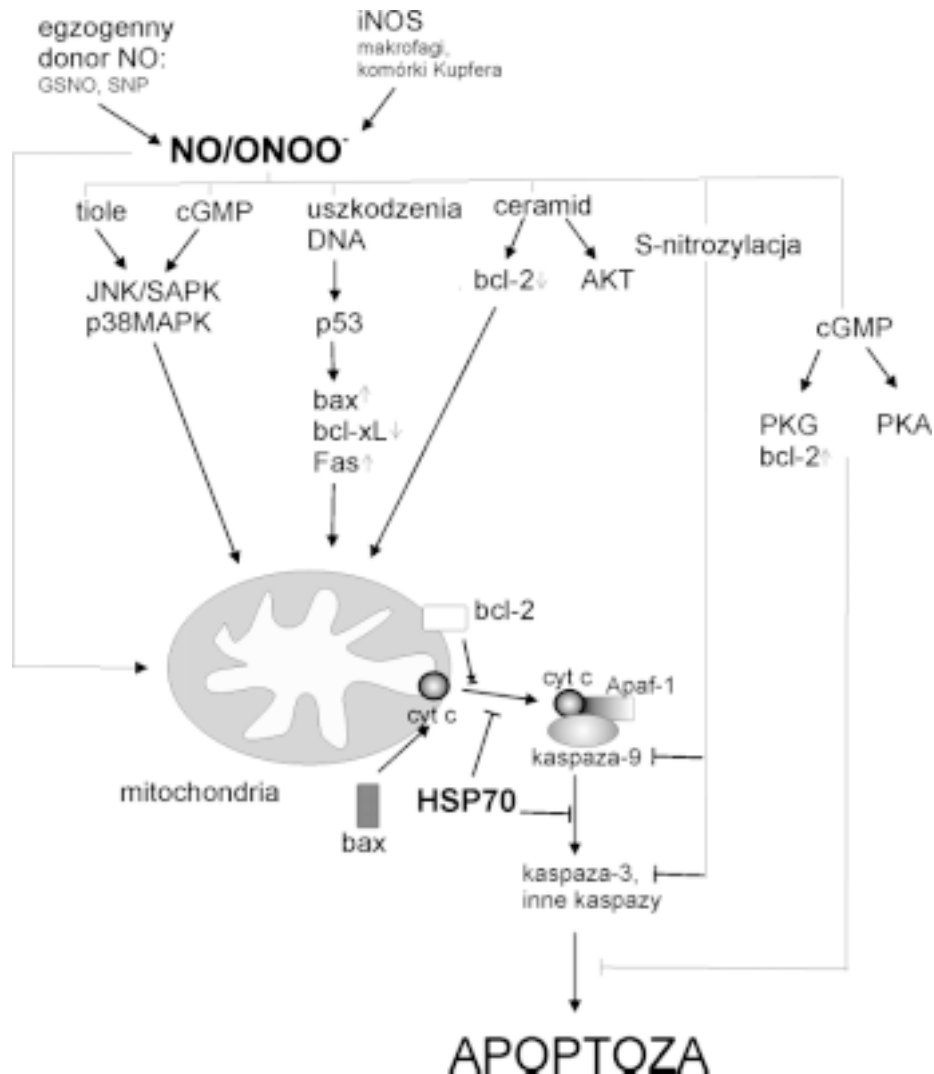
(i) w mechanizmach cytotoksyczności przeciwko komórkom nowotworowym i patogenom,

(ii) w wielu procesach zapalnych, niedokrwienych i neurodegeneracyjnych, gdzie NO jest bezpośrednią przyczyną niszczenia komórek i tkanek [4,41].

Indukcję apoptozy przez NO wiąże się głównie z aktywacją mitochondrialnego szlaku apoptozy, wiążącego się z uwolnieniem cytochromu c z mitochondrium na wskutek utraty potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$) (ryc. 2) [48]. Uwolniony cytochrom c działa jako kofaktor dla zależnego od dATP/ATP czynnika aktywującego proteazę-1 – Apaf-1 (*dATP/ATP dependent apoptotic protease activating factor-1*), który tworzy wraz z prokaspazą-9 kompleks, zwany apoptosomem. W dalszej kolejności białko Apaf-1 zmienia swoją konformację przestrzenną, co umożliwia wiązanie N-końcowej części jego domeny CARD (*caspase-recruiting domain*) z obszarem CARD prokaspazy-9 [6,29]. Oddziaływanie to prowadzi do aktywacji prokaspazy-9, która proteolitycznie tnie kaspazę-3, również związaną z apoptosomem. Wprawdzie mechanizm indukcji wypływu cytochromu-c z mitochondriów nie został dokładnie poznany, ale wiadomo, że biorą w nim udział pro-apoptotyczne białka z rodziny Bcl-2: Bax, Bak, Bad, Bik i Noxa [6,29]. Innym białkiem mitochondrialnym uwalnianym podczas apoptozy jest Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis (IAP) - binding protein with low pI*), który jest dimerem wiążącym i neutralizującym hamujące działanie IAP. Prowadzi to do bardziej wydajnej aktywacji kaspazy-3 przy udziale apoptosomu [50].

5.1. Aktywacja mitochondrialnego szlaku apoptozy

Tlenek azotu może indukować apoptozę wpływając na uwalnianie cytochromu c z mitochondrium. Niskie stężenia NO odwracalnie hamują oksydazę cytochromu (kompleks IV) współzawodnicząc z tlenem, co prowadzi do wzrostu produkcji H_2O_2 i O_2 [42,46]. W rezultacie powstający rodnik tlenowy – $O_2^{\cdot-}$ oddziałuje z NO tworząc $ONOO^-$. Zarówno anionorodnik ponadtlenkowy, jak i $ONOO^-$ mogą powodować degradację fosfolipidu – kardiolipiny, co prowadzi do nieodwracalnego zatrzymania łańcucha oddechowego i apoptozy. Cytochrom c pozostaje normalnie związany z kardiolipiną na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, zaś jego peroksydacja przez $ONOO^-$ lub $O_2^{\cdot-}$ prowadzi do uwolnienia cytochromu c [20,49]. Niektórzy autorzy wskazują również na rolę peroksydacji innych lipidów mitochondrialnych w indukcji apoptozy, jednak brak jest dowodów bezpośrednich [39].



RYCINA 2. Pro- i antyapoptotyczne szlaki uruchamiane przez NO

5.2. Indukcja uszkodzeń DNA oraz ekspresji białka p53

Rodniki tlenowe (ROS) oraz reaktywne pochodne tlenku azotu (RNOS) mogą prowadzić do uszkodzenia DNA, w efekcie końcowym indukując apoptozę komórki w odpowiedzi na nieodwracalne uszkodzenie materiału genetycznego. Istnieją trzy mechanizmy, za pośrednictwem których NO może uszkadzać DNA (ryc. 2). Pierwszy mechanizm obejmuje bezpośrednią reakcję ONOO⁻ z DNA, drugi zahamowanie procesów naprawczych, zaś trzeci wiąże się ze zwiększoną produkcją czynników alkilujących oraz anionorodnika ponadtlenkowego [10]. W środowisku beztlenowym, RNOS powodują jednoniciowe uszkodzenia DNA, jak również deaminacje cytozyny, adeniny i guaniny [10,35].

Uszkodzenie DNA prowadzi do włączenia mechanizmów naprawczych związanych z ekspresją białka p53 oraz aktywacją enzymu jądrowego polimerazy poli(ADP) rybozy (PARP), co sprzyja indukcji apoptozy [31,44]. Stres komórkowy, związany z uszkodzeniami DNA, zazwyczaj w postaci pęknięć jednej lub obu nici, stres oksydacyjny oraz aktywacja onkogenów powodują apoptozę indukowaną wzrostem aktywności białka p53. Białko to może w odwracalny sposób zatrzymywać cykl komórkowy w fazie G1, dzięki temu że tworzy połączenia m.in. z białkiem TBF, będącym składową czynnika transkrypcyjnego TFIID. Powstały kompleks blokuje transkrypcję niektórych genów w tym onkogenów c-fos i c-jun, których produkty są niezbędne do przebiegu cyklu komórkowego. Prawidłowy przebieg replikacji DNA w komórce uniemożliwia tworzenie białka p53 takich połączeń [4,22]. Białko p53 może ponadto indukować apoptozę poprzez wzrost ekspresji genów kodujących białka będące bezpośrednimi wykonawcami szlaku śmierci: Fas, FasL, DR5, DcR1 i Bax [4,22]. Wykazano, że NO powoduje wzrost ekspresji białka p53 i jego akumulację w komórce, co z kolei powoduje zahamowanie cyklu komórkowego oraz wzrost ekspresji proapoptotycznego białka bax i zmniejszenie ekspresji anty-apoptotycznego białka bcl-2 [21,25].

5.3. Aktywacja szlaków apoptotycznych pod wpływem ceramidu

Wykazano, że NO powoduje wzrost produkcji ceramidu poprzez zwiększenie aktywności obojętnej sfingomielinazy (N-SMase) w komórkach HL-60 oraz komórkach kłębuszka nerkowego [26]. Ceramid stanowi ważny wtórny przekaźnik informacji w komórkach, wpływający na szereg procesów biologicznych, takich jak: zapalenie, wzrost komórek, różnicowanie i apoptoza. Pomimo możliwej syntezy *de novo*, większość sfingomielin obecnych na terenie komórki może stanowić źródło ceramidu dzięki aktywności dwóch enzymów: kwaśnej sfingomielinazy (A-SMase) oraz obojętnej sfingomielinazy (N-SMase) [26]. Udział ceramidu w indukcji apoptozy zależy od typu badanych tkanek oraz komórek [12,26] i wiąże się z aktywacją kilku szlaków apoptozy, m.in. aktywacją kaspazy-9 i -3, aktywacją szlaku kinaz JNK/SAPK, zahamowaniem kinazy białkowej B/Akt oraz supresją ekspresji bcl-2 [12,26] (ryc. 2).

5.4. NO aktywuje kinazy białkowe

Apoptoza indukowana przez NO wiąże się z aktywacją szeregu kinaz białkowych serynowo-treoninowych – MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), w zależności od zastosowanego donora NO oraz rodzaju badanych komórek. MAP kinazy są aktywowane w odpowiedzi na stymulację receptorów sprzęgniętych z białkami G oraz aktywację białek G. Aktywacja „małego białka G” – białka Ras prowadzi do aktywacji kaskady kinaz MAP, które fosforylują i regulują aktywność kolejnych kinaz MAP na szlaku przekazywania sygnału oraz enzymów i czynników transkrypcyjnych (m.in. c-Jun, CREB), wpływających na ekspresję wielu genów (ryc. 2) [11,41,45].

Wykazano, że NO może aktywować kinazy MAP, takie jak: JNK (*c-Jun N terminal kinase*)/SAPK (*stress-activated protein kinase*) oraz p38 MAPK, biorące udział w indukcji apoptozy [11,41,45]. Atenuacja kinazy JNK/SAPK za pomocą antysensownych nukleotydów hamowała apoptozę oraz akumulację białka p53 po podaniu S-nitrozoglutationu komórkom RAW 264.7 [27,28]. W podobny sposób wykazano, że w komórkach RAW 264.7

poddawanych działaniu donorów SNP (nitroprusydku sodu) lub S-nitrozoglutationu, nadekspresja kinazy białkowej C (PKC) chroniła komórki przed indukcją apoptozy przez NO [8]. W komórkach HL-60, apoptoza indukowana przez SNP była blokowana przez inhibitor kinazy p38, SB203580 [28]. W komórkach neuronalnych SH-SY5Y donor jonu nadazotynowego, SIN-1 indukował fosforylację kinazy p38 MAPK oraz kinazy ERK (*extracellular signal-related kinase*), prowadzącą do aktywacji kaspazy 3 oraz fragmentacji DNA [40].

6. ANTY-APOPTOTYCZNE DZIAŁANIE NO

Chociaż NO może w pewnych warunkach oraz w pewnych komórkach indukować apoptozę, to jednak w wielu badaniach udało się wykazać, że w niskich stężeniach NO ma działanie cytoprotekcyjne. Podłoże biochemiczne antyapoptotycznego działania NO wiąże się z uruchomieniem szeregu komórkowo-specyficznych szlaków transdukcji sygnału, z których najważniejszym szlakiem wydaje się obecnie być szlak zależny od cGMP. Ogólnie, antyapoptotyczne działanie NO możemy podzielić na mechanizmy zależne i niezależne od cGMP (ryc. 2). NO może również bezpośrednio wpływać na aktywność enzymów biorących udział w apoptozie poprzez S-nitrozylację.

6.1. Efekty ochronne zależne od cGMP

Jak wspomniano powyżej, związanie NO z hemem obecnym w cyklicznym guanylu prowadzi do aktywacji enzymu i produkcji cGMP. Mechanizmy działania cGMP można naśladować za pomocą 8-bromo-cGMP, analogu cGMP, zaś dodanie 1-*H*-oksodiazolo-4,3- α chinoksalino-1-onu (ODQ) prowadzi do zahamowania tych szlaków. Efekt działania NO za pośrednictwem cGMP może mieć charakter zarówno cytoprotekcyjny, jak i prowadzący do indukcji apoptozy, w zależności od typu komórek [45]. Wykazano, że cGMP chroni przed apoptozą komórki nerwowe, hepatocyty i limfocyty [41,45]. W hepatocytach apoptoza indukowana przez TNF- α oraz aktywność kaspazy-3 ulegała redukcji przy ekspozycji na 8-bromo-GMP, zaś użycie KT5823 – inhibitora kinazy białkowej G (PKG), zależnej od cGMP znosiło ochronny charakter analogu cGMP. Supresja aktywności kaspazy-3 w hepatocytach eksponowanych na NO była częściowo blokowana przez ODQ [25]. Kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów są aktywne tylko w niektórych typach komórek. W szczurzych komórkach mięśniówki gładkiej naczyń, 8-bromo-cGMP oraz S-nitrozoglutation indukowały apoptozę w komórkach zakażonych adenowirusem z genem dla PKG. Do apoptozy nie dochodziło ani w komórkach zakażonych, ani niezakażonych adenowirusem i dopiero zmiana poziomu PKG zmieniała wrażliwość tych komórek na NO oraz cGMP [9].

Zahamowanie PKA za pomocą specyficznego inhibitora KT5720 w komórkach hepatocytów blokowało ochronny efekt cGMP, ale jedynie częściowo, zaś cykliczny AMP i cGMP modulowały apoptozę indukowaną przez TNF- α w sposób zależny i niezależny od PKA [33].

Inną drogą ochronną zależną od cGMP jest hamowanie przez NO apoptozy indukowanej przez produkcję ceramidu. W ludzkich monocytach U937 egzogeny NO hamuje apoptozę indukowaną przez TNF- α i uwalnianie ceramidu, zaś ochronny efekt NO działa za pośrednictwem szlaku zależnego od cGMP [3].

Ochronny efekt cGMP może być również indukowany poprzez wzrost ekspresji białek z rodziny bcl-2 (ryc. 2). Wspomniana rodzina białek bcl-2 jest bezpośrednio zaangażowana w utrzymanie integralności mitochondriów. Do chwili obecnej w obrębie tej rodziny zidentyfikowano 18 białek o działaniu zarówno pro-, jak i anty-apoptotycznym. Większość anty-apoptotycznych białek z rodziny bcl-2 zawiera C-kończącą domenę hydrofobową, która umożliwia ich zakotwiczenie w błonie mitochondrialnej, w błonie jądrowej oraz w siateczce śródplazmatycznej. Białka bcl-2 i bcl-X_L działają jako „strażnicy” mitochondrium, hamując uwalnianie cytochromu c i przeciwdziałając kaskadowej aktywacji kaspaz. Pro-apoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 (Bid, Bax, Bal, Bim i Noxa) są zlokalizowane głównie w cytoplazmie lub są związane z białkami cytoszkieletu. Po zadziałaniu czynników apoptotycznych białka te ulegają translokacji do zewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie spełniają swoją rolę [29, 43].

NO zapobiega spadkowi ekspresji białka bcl-2 oraz mRNA w komórkach limfocytów B [18]. NO może również zmieniać poziom ekspresji bcl-2 i bax indukując czynnik transkrypcyjny p53. NO podany myszom „knock-out” dla genu iNOS zmniejszało poziom p53, co z kolei zmniejszało poziom ekspresji pro-apoptotycznego bax oraz zwiększało ekspresję anty-apoptotycznego bcl-2 i bcl-xl. Zmiana stosunku ekspresji bax i bcl-2 w obecności NO może mieć znaczący wpływ na przebieg apoptozy [30].

6.3. Zmiany ekspresji białek szoku cieplnego

NO indukuje również ekspresję białek o charakterze cytoprotekcyjnym, zwanych białkami szoku cieplnego – hsp (*heat shock proteins*) (ryc. 2). Cytokiny indukują ekspresję hsp 70 w drodze zależnej od NO i chronią komórki wysepek trzustkowych przed apoptozą, jednak nie indukują ekspresji hsp 70 w myszach z „knock-out” genu iNOS [34]. Mechanizm molekularny związany z tym procesem ma prawdopodobnie dwa podłoża: hsp70 hamuje oligomeryzację Apaf-1, wiążąc się z domeną rekrutującą kaspazy – CARD (*caspase-recruiting domain*), co prowadzi do wstrzymania tworzenia się apoptosomu [1] lub hsp70 pośredniczy, jako białko opiekuńcze, w transporcie białek do mitochondrium, hamując uwalnianie cytochromu c [37]. Hsp90 oddziałuje również na samą produkcję NO przez eNOS i iNOS. Wykazano, że hsp90 działa jako allosteryczny aktywator eNOS, zwiększając aktywność eNOS poprzez wzmocnienie wiązania się kalmoduliny. W przypadku iNOS wykazano jedynie zdolność hsp90 do zwiększania produkcji NO, zaś dokładny mechanizm tego oddziaływania nie jest do końca poznany [52].

Ponadto, w ludzkich komórkach endotelialnych oraz komórkach COS-7 wykazano, że hsp 70 może wpływać bezpośrednio na produkcję cGMP, wiążąc się z cytozolową cyklazą guanylową [2], co świadczy o nowej, niezbadanej dotychczas roli hsp70 w regulacji szlaków zależnych od cGMP.

6.4. NO hamuje kaspazy w drodze S-nitrozylacji

Kaspazy stanowią rodzinę proteaz cysternowych, składającą się z 14 izoform, które funkcjonalnie można podzielić na biorące udział w apoptozie (kaspaza -2, -3, -6, -7, -8, -9 i -10) oraz takie, których najważniejszą rolą jest udział w aktywacji cytokin (kaspaza -1, -4, -5 i -11). Niewiele wiadomo o roli kaspazy -12, -13 i -14. Kaspazy są syntetyzowane jako zymogeny, a sygnał apoptotyczny powoduje konwersję prekursorów do aktywnych enzymów, indukowaną oligomeryzacją. Jak większość białek, kaspazy również podlegają modyfikacjom postranslacyjnym, zmieniającym ich aktywność. Jednym z głównych rodzajów modyfikacji kaspaz jest fosforylacja zazwyczaj związana z supresją apoptozy mediowaną przez receptory czynników wzrostowych [43,50].

Innym sposobem post-translacyjnej modyfikacji kaspaz jest S-nitrozylacja. NO jest cząsteczką obojętną i wykazuje słabą reaktywność z grupami tiolowymi w pH neutralnym, natomiast pochodna NO – ONOO⁻ reaguje z grupami tiolowymi tysiąc razy szybciej niż sam NO. Wykazano, że miejsca aktywne kaspazy-1, -2, -3, -4, -6, -7 i -8 ulegają odwracalnej S-nitrozylacji, zaś indukcja apoptozy w drodze Fas/FasL prowadzi do denitrozylacji kaspazy 3 (ryc. 2) [17,32,36]. Denitrozylacja zwiększa aktywność kaspazy-3, choć nie wpływa na obróbkę prokaspazy-3. Szlak wiodący do denitrozylacji nie został dotychczas w pełni poznany, jednak uważa się, że nitrozylacja i denitrozylacja stale towarzyszą apoptozie [32,36]. Zdolność NO do S-nitrozylacji kaspaz będzie zależała od dostępności NO oraz O₂⁻ i innych związków zawierających grupy tiolowe, takich jak: glutation czy wolna cysteina.

7. ZNACZENIE ROLI TLENKU AZOTU W INDUKCJI APOPTOZY ORAZ PRZEŻYWANIU KOMÓREK

Utrzymanie homeostazy jest możliwe dzięki zachowaniu równowagi pomiędzy podziałem komórek a ich śmiercią. Zaburzenie tej równowagi ma związek z patogenezą szeregu chorób, zaś NO może wpływać na kierunek równowagi, indukując lub hamując apoptozę. Przykładowo, apoptoza za pośrednictwem NO może pogarszać funkcjonowanie narządów, prowadząc do m.in. miażdżycy naczyń oraz chorób neurodegeneracyjnych. Z drugiej strony, odpowiednie ilości NO mogą hamować niepożądaną apoptozę, jaka ma miejsce w przypadku niewydolności wątroby podczas sepsy, oraz uszkodzenia komórek endotelialnych (miażdżycy i przerostu intymy) czy komórek neuronalnych wskutek niedotlenienia. Z drugiej strony antyapoptotyczne działanie NO w stosunku do komórek z uszkodzonym DNA, które powinny zginąć w wyniku aktywacji szlaków apoptotycznych, może prowadzić do rozwoju nowotworów. NO wydaje się mieć duże znaczenie w patogenezie chorób zakaźnych. Przykładowo, NO produkowany w zakażeniu *Mycobacterium tuberculosis* ma na celu zabicie makrofagów zakażonych prątkami, jednak jednocześnie może powodować apoptozę limfocytów T odpowiedzialnych za rozwój odpowiedzi immunologicznej przeciwko zakażeniu prątkami [38].

Tym samym, regulacja produkcji NO stanowi cenne potencjalne narzędzie terapeutyczne, które można wykorzystać w terapii chorób, w przypadku których mamy do czynienia ze zmienionym poziomem indukcji apoptozy i/lub tlenku azotu.

LITERATURA

- [1] AYMAN S, BALKIR SMS, ROBBINS PD, ALNEMRI ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 476–483.
- [2] BALASHOVA N, CHANG FJ, LAMOTHE M, SUN Q, BEUVE A. Characterization of a novel type of endogenous activator of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 2005; **280**: 2186–2196.
- [3] BARSACCHI RC, SESTILI P, CANTONI O, MONCADA S, CLEMENTI E. Cyclic GMP-dependent inhibition of acid sphingomyelinase by nitric oxide: an early step in protection against apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; **9**: 1248–1255.
- [4] BLAISE GA, GANGAL M, AUTHIER S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005; **208**: 177–192.
- [5] BREDT D, SNYDER S. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 682–685.
- [6] BRENNER C, LE BRAS M, KROEMER G. Insights into the mitochondrial signaling pathway: what lessons for chemotherapy? *J Clin Immunol* 2003; **23**: 73–80.
- [7] BRITO C, NAVILIAT M, TISCORNIA AC, VUILLIER F, GUALCO G, DIGHIERO G, RADIR, CAYOTA AM. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* 1999; **162**: 3356–3366.
- [8] CALLSEN D. Role of mitogen-activated protein kinases in S-nitrosoglutathione-induced macrophage apoptosis. *Biochemistry* 1999; **38**: 2279–2286.
- [9] CHICHE JD, SCHLUTSMAYER SM, BLOCH DB, DE LA MONTE SM, ROBERTS JD, FILIPPOV G, JANSSENS SP, ROSENZWEIG A, BLOCH KD. Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP. *J Biol Chem* 1999; **273**: 34263–34271.
- [10] CROW JP. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. *Adv Exp Med Biol* 1996; **387**: 147–161.
- [11] DAVIS R. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14553–14556.
- [12] Di NARDO A, BENASSI L, MAGNONI C, COSSARIZZA A, SEIDENARI S, GIANNETTI A. Ceramide 2 (N-acetyl sphingosine) is associated with reduction in Bcl-2 protein levels by Western blotting and with apoptosis in cultured human keratinocytes. *Brit J Dermatol* 2002; **143**: 491–497.
- [13] DUNCAN AJ. Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med* 2004; **26**: 67–96.
- [14] ELFERING SL, SARKELA TM, GIULIVI C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002; **277**: 38079–38086.
- [15] ESPEY MG, DOUGLAS TD, SANDHYA X., CITRIN D, VITEK MP, WINK DA. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Ann NY Acad Sci* 2002; **962**: 195–206.
- [16] FUKUTO JM, SWITZER CH, MIRANDA KM, WINK DA. Nitroxyl (HNO): chemistry, biochemistry, and pharmacology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005; **45**: 335–355.
- [17] GASTON BM, CARVER J, DOCTOR A, PALMER LA. S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv* 2003; **3**: 253–263.
- [18] GENARO AM, ALVAREZ A, MARTÍNEZ C, BOSCA L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1884–890.
- [19] GHAFOURIFAR PC. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005; **26**: 190–195.
- [20] GIULIVI C, PODEROSO JJ, BOVERIS A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11038–11043.

- [21] GORDON SA, ABOU-JAOUDE W, HOFFMAN RA, MCCARTHY SA, KIM YM, ZHOU X, ZHANG XR, SIMMONS RL, CHEN Y, SCHALL L, FORD HR. Nitric oxide induces murine thymocyte apoptosis by oxidative injury and a p53-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 2001; **70**: 87–95.
- [22] HARRIS SL, LEVINE AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; **24**: 2899–2908.
- [23] HAYNES V, ELFERING SL, SQUIRES RJ, TRAASETH N, SOLIEN J, ETTL A, GIULVIC. Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in Pathophysiology. *IUBMB Life* 2003; **55**: 599–603.
- [24] HESS DT, M. A., KIM SO, MARSHALL HE, STAMLER JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 150–166.
- [25] HORTELANO SH, HIRSCH N, SUSIN T, SANTOS AM, BOSCA I, KROEMER LG. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Letters* 1997; **410**: 373–377.
- [26] HUWILER A, PFEILSCHIFTER J, van den BOSCH H. Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 7190–7195.
- [27] JUN CD, OH CD, KWAK HJ, PAE HO, YOO JC, CHOI BM, CHUN JS, PARK RK, CHUNG HT. Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-Terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase, p38 Kinase, and CPP-32 protease pathways. *J Immunol* 1999; **162**: 3395–3401.
- [28] JUN CD, KWAK HJ, YOO JC, CHOI BM, OH CD, CHUN JS, PAIK SG, PARK YH, CHUNG HT. Modulation of nitric oxide-induced apoptotic death of HL-60 cells by protein kinase C and protein kinase A through mitogen-activated protein kinases and CPP32-like protease pathways. *Cell Immunol* 1999; **194**: 36–46.
- [29] KIM R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **333**: 336–343.
- [30] KOGLIN J, GRANVILLE DJ, GLYSING-JENSEN T, MUDGETT JS, CARTHY CM, McMANUS BM, RUSSELL ME. Attenuated acute cardiac rejection in NOS2 $-/-$ recipients correlates with reduced apoptosis. *Circulation* 1999; **99**: 836–842.
- [31] LAVAL F, LAVAL WD. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997; **131**: 175–191.
- [32] LI J, TALANIAN RV, KIM YM. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**: 419–424.
- [33] LI J, YANG S, BILLIAR TR. Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor α -mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and cytochrome c release in primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 13026–13034.
- [34] LIU D, PAVLOVIC D, CHEN M, FLODSTROM M, SANDLER S, EIZIRIK D. Cytokines induce apoptosis in beta-cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS $-/-$). *Diabetes* 2000; **49**: 1116–1122.
- [35] MANCARDI D, THOMAS DD, KATORI T, TOCCHETTI CG, ESPEY MG, MIRANDA KM, PAOLOCCI N, WINK DA. The chemical dynamics of NO and reactive nitrogen oxides: a practical guide. *Curr Mol Med* 2004; **4**: 723–740.
- [36] MANNICK JB, LIU L, HESS DT, ZENG M, MIAO QX, KANE LS, GOW AJ, STAMLER JS. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999; **284**: 651–654.
- [37] MOSSER DD, CARON AW, BOURGET L, MERIIN AB, SHERMAN MY, MORIMOTO RI, MASSIE B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 7146–7159.
- [38] NATHAN C, SHILOH MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8841–8848.
- [39] NOMURA K, IMAI H, KOUMURA T, ARAI M, NAKAGAWA Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 29294–29302.
- [40] OH-HASHI K, MARUYAMA W, YI H, TAKAHASHI T, NAOI M, ISOBE K. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **24**: 504–509.
- [41] PILZ RB. Role of cyclic GMP in gene regulation. *Front Biosci* 2005; **1**: 1239–1268.
- [42] RADI R, CASSINA A, HODARA R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 2002; **383**: 401–409.

- [43] RATHMELL JC, THOMPSON CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1999; **17**: 781–828.
- [44] RICH T, ALLEN RL, WYLLIE AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; **407**: 777–783.
- [45] RUSSWURM M. Guanylyl cyclase: NO hits its target. *Biochem Soc Symp* 2004; **71**: 51–63.
- [46] SARTIP, ARESE M, BACCHI A, BARONE MC, FORTE E, MASTRONICOLA D, BRUNORI M, GIUFFRÉ A. Nitric oxide and mitochondrial complex IV. *IUBMB Life* 2003; **55**: 605–611.
- [47] SAVILL J, FADOK V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; **407**: 784–788.
- [48] SCAFFIDI CF, SRINIVASAN A, FRIESEN C, LI F, TOMASELLI KJ, DEBATIN KM, KRAMMER PH, PETER ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; **17**: 1675–1687.
- [49] SHIDOJI YH, KOMURA S, OHISHI N, YAGI K. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 343–347.
- [50] SHIOZAKI EN. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 2004; **29**: 486–494.
- [51] WINK DA, MIRANDA KM, ESPEY MG. Cytotoxicity related to oxidative and nitrosative stress by nitric oxide. *Exp Biol Med* 2001; **226**: 621–623.
- [52] YOSHIDA M, XIA YJ. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; **278**: 36953–36958.
- [53] XU WCI, MONCADA S. Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell Res* 2005; **15**: 63–65.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 07.09.2005 r.

Przyjęto: 10.10.2005 r.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa