ZBIGNIEW ROLIŃSKI

Tlenek azotu – domniemana substancja neuroprzekaźnikowa

Katedra Farmakologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Powszechnie przyjęto, ażeby szereg substancji biologicznych innych niż acetylocholina (Ach) i katecholaminy określać mianem – domniemane neuroprzekaźniki. Wykazano również, że pewne peptydy współistnieją w niektórych neuronach w charakterze neuroprzekaźników. Nadal pozostaje sprawą nie wyjaśnioną, czy te peptydy spełniają rolę podstawowych neuroprzekaźników, czy też, co jest bardziej prawdopodobne, spełniają rolę modulatorów w procesie neurotransmisji pomiędzy aksonem a komórkami wykonawczymi (11).

W przypadku serotoniny (5-hydroksytryptaminy) wykazano, że spełnia ona rolę neuroprzekaźnika w specyficznych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i obwodowego układu nerwowego. Fizjologiczne znaczenie serotoninergicznej neurotransmisji nie zostało w pełni dotychczas wyjaśnione, ale uważa się, że serotonina bierze udział w termoregulacji, w cyklach snu oraz uczestniczy w pozapiramidowej kontroli motoryki mięśni szkieletowych. Dalej wykazano, że kwas gamma-aminomasłowy (GABA) spełnia rolę neuroprzekaźnika hamowania w niektórych strukturach OUN.

Jakkolwiek wiele domniemanych substancji neuroprzekaźnikowych przypuszczalnie uczestniczy w przekaźnictwie w obrębie OUN i autonomicznego układu nerwowego (AUN), to jednak jak dotychczas farmakologiczne podstawy ośrodkowego i obwodowego działania leków można było dostatecznie wyjaśnić na podstawie cholinergicznych i adrenergicznych mechanizmów.

Obecnie, w świetle nowych faktów, nie można jednak ograniczać się do interpretacji procesów neuroprzekaźnictwa biorąc jedynie pod uwagę Ach i katecholaminy.

Tlenek azotu

Tlenek azotu (NO) jest obecnie tą substancją pochodzenia endogennego, która jest uważana za przekaźnik wielu fizjologicznych i patofizjologicznych procesów w organizmie (13). W porównaniu do klasycznych neuroprzekaźników i neuropeptydów, tlenek azotu jest wyjątkowo małą i prostą cząsteczką zawierającą pojedynczy atom azotu i tlenu, a w powietrzu atmosferycznym występuje jako gaz. Ponadto wiadomo, że tlenek azotu jest substancją powstającą w wyniku palenia papierosów, tworzenia się smogu lub wytwarzaną w trakcie pracy silników spalinowych. W atmosferze powietrza tlenek azotu reaguje z tlenem tworząc NO_2. W przeciwieństwie do NO_2, czysty tlenek azotu nie wywołuje podrażnień. W organizmie przemienia hemoglobinę w methemoglobinę przez utlenianie Fe^{2+} do Fe^{3+}. Ponieważ methemoglobina nie może wiązać ani transportować tlenu, dlatego tlenek azotu jest potencjalnie toksyczny. Niezależnie od właściwości fizykochemicznych, uważa się dzisiaj, że tlenek azotu jest jednym z ważniejszych przekaźników komórkowych uczestniczących m.in. w rozszerzaniu naczyń krwionośnych, neuroprzekaźnictwie i działaniu przeciwko drobnoustrojom (2).

Synteza tlenku azotu. Synteza NO ma miejsce w licznych tkankach ssaków, obejmujących m.in. komórki śródbłonka, płytki krwi, leukocyty, fibroblasty, komórki Kuppfera, hepatocyty, korę nadnerczy.

Naturalnym źródłem tlenku azotu w organizmie jest głównie L-arginina, aminokwas z którego powstaje NO dzięki działaniu syntezy tlenku azotu (NOS). Dopiero niedawno udało się wykazać, że synteza NO zachodzi w specyficznych komórkach ssaków. Dalej stwierdzono, że tlenek azotu jest identyczny z pochodzącym ze śródbłonka czynnikiem rozszerzającym naczynia (endothelial derived relaxing factor – EDRF) (7). Wykazano również, że rozszerzanie naczyń przez Ach i inne czynniki zależy od jonów Ca^{2+}. W 1988 r. wykazano, że L-arginina jest substratem dla tlenku azotu w komórce śródbłonka, a tlenek azotu jest tą aktywną substancją pośredniczącą pomiędzy L-argininą a NO_2 i NO_3 (16). Tlenek azotu jest syntetyzowany również w mózgu w wyniku pobudzenia receptora N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) (15).

Reakcja syntezy tlenku azotu z L-argininy ma charakter dwustopniowy. Najpierw z L-argininy pod wpływem NOS powstaje związek pośredni – N-hydroksy-L-arginina (L-NOHA). W drugim etapie reakcji dochodzi do utleniania L-NOHA przy udziale NOS do tlenku azotu i cytruliny.

NOS występuje w dwóch izoformach: jako forma konstytutywna (constitutive – cNOS) i forma indukowana (inducible – iNOS). W śródbłonku naczyniowym i móżdżku występuje cNOS (12), zależna od układu Ca^{++}/kalmodulina, wydzielająca tlenek azotu w małych ilościach (nanomole). NOS w śródbłonku naczyniowym może być pobudzana przez różne czynniki. Przy wydzielaniu tzw. podstawowym komórki śródbłonka wydzielają przeważającą część tlenku azotu. Przy tzw.

wydzielaniu stymulowanym, uwalnianie NO odbywa się przy udziale agonistów zależnych od receptora cholinergicznego np. Ach, ATP czy bradykininy, to jest związków, które podwyższają poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{++}.

iNOS prototypowo jest indukowana w makrofagach i hepatocytach, neutrofilach, mięśniach gładkich naczyń. Ten proces indukcji NOS jest odpowiedzią na stymulację immunologiczną (21). Enzym ten wymaga kilkugodzinnej ekspozycji na cytokininy i liposacharydy, a tlenek azotu jest wytwarzany przez kilka godzin w dużych ilościach (mikromolach), wystarczających dla zniszczenia patogennych mikroorganizmów. iNOS jest niezależna od układu Ca^{++} (kalmodulina).

Farmakologiczna modulacja syntezy i działania tlenku azotu. Oprócz endogennego donora tlenku azotu, L-argininy, istnieje również wiele egzogennych donorów tego związku, które działają poprzez uwalniany tlenek azotu. Organiczne związki o charakterze azotanów lub związków nitrozowych, takich jak nitrogliceryna, nitroprusydek sodowy, dwuazotan izosorbitolu oraz SNAP (S-nitrozo-N-penicylamina) ulegają w tkankach metabolizmowi lub spontanicznemu rozpadowi, stając się dawcami tlenku azotu. Farmakodynamika tych związków przypomina w wielu aspektach fizjologiczne efekty endogennego działania tlenku azotu (1).

Efektory tlenku azotu

Najlepiej poznanym efektorem dla tlenku azotu jest obecna w wielu tkankach cyklaza guanylowa (GC). Miejscem aktywnym tego enzymu, w którym wiąże się tlenek azotu jest hem. Przyłączenie tlenku azotu do Fe^{2+} w pierścieniu porfirynowym hemu powoduje ostateczne pobudzenie GC (14). Wzrost poziomu cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) wywołany przez tlenek azotu może wpływać na kanał jonowy, kinazę białkową (zależną od cGMP) lub aktywność fosfodiesterazy. Następstwem tego, np. w komórkach mięśni gładkich jest wzrost poziomu cGMP, co pobudza kinazę białkową i prowadzi do zwiotczenia mięśni. Przyczyną spadku napięcia mięśni gładkich może być również obniżenie stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{++} spowodowane przez cGMP.

Wpływ tlenku azotu na krążenie. Uwalnianie tlenku azotu pod wpływem śródbłonkowej cNOS jest stymulowane nie tylko przez niektórych agonistów receptora muskarynowego (np. Ach), ale może zachodzić pod wpływem innych czynników. Niezależnie od receptora wydzielanie tlenku azotu mogą stymulować polikationy lub inhibitory ATP-azy Ca^{++}. Również pewne bodźce fizyczne, jak np. pulsacyjne rozciąganie ściany naczyń czy niskie ciśnienie tlenu mogą stymulować wydzielanie tlenku azotu. Dzieje się tak dlatego, że związek ten powstający przy udziale śródbłonkowego cNOS uczestniczy w samoregulującym się mechanizmie kontroli przepływu krwi (3, 4, 6).

Wykazano również, że bodźce odpowiedzialne za stany zapalne lub zakażenia organizmu mogą stymulować iNOS w śródbłonku i mięśniówce gładkiej naczyń. W ten sposób tlenek azotu bierze również udział w miejscowych reakcjach układu krążenia na infekcje lub stany zapalne (17).

Tlenek azotu ogranicza agregację płytek krwi oraz ogranicza przyczepność i skupianie się leukocytów na powierzchni błony wewnętrznej naczyń. Dlatego zakłócenie syntezy tlenku azotu sprzyja powstawaniu arteriosklerozy (10, 18).

Neurotransmisyjne funkcje tlenku azotu

Tlenek azotu nie jest zwykłym, fizjologicznym neuroprzekaźnikiem, ponieważ nie posiada jego charakterystycznych cech: nie gromadzi się w pęcherzykach synaptycznych, nie jest uwalniany przez egzocytozę i nie działa na typowe receptory błonowe. Przypuszczalnym receptorem dla tlenku azotu jest jon żelazawy (Fe^{2+}), przy aktywnym miejscu GC (20). Tlenek azotu jako gaz może działać zarówno w neuronie, w którym powstaje jak i dyfundować do otaczającego gleju i innych neuronów. Dlatego przyjmuje się, że tlenek azotu pełni funkcję neuroprzekaźnika zarówno w obwodowym jak i ośrodkowym układzie nerwowym (19). W mózgu, tlenek azotu uczestniczy w kontroli procesów uczenia się, pamięci oraz pośredniczy w reakcjach sterowanych przez aminokwasy pobudzające. W obwodowym układzie nerwowym tlenek azotu może pełnić funkcję neuroprzekaźnika uwalnianego z zakończeń nieadrenergicznych, niecholinergicznych (NANC). Wcześniej uważano, że obwodowa kontrola neuronalna nad perystaltyką jelit i synchronizacją czynności zwieraczy żołądka i jelit jest związana z unerwieniem NANC, ponieważ nie był znany odpowiedni przekaźnik. Dzisiaj można przyjąć, że strefy unerwione przez NANC mogą być przeklasyfikowane jako struktury tlenku azotu, ponieważ ten gaz może być neuroprzekaźnikiem dla NANC w obrębie przewodu pokarmowego, zewnętrznych narządów płciowych i układu oddechowego (5).

Perspektywy wykorzystania tlenku azotu w lecznictwie

Wielokierunkowy udział tlenku azotu w funkcjach wewnątrzustrojowych stwarza potencjalne możliwości wykorzystania tego związku w lecznictwie. Niezmiernie istotne dla zastosowań praktycznych może mieć działanie miolityczne tlenku azotu na naczynia krwionośne, zachodzące na drodze NO/cGMP. Szereg endogennych związków takich jak Ach, histamina, bradykinina, trombina czy ATP, pobudza komórki śródbłonka naczyniowego do wydzielania tlenku azotu, w następstwie wewnątrzkomórkowego wzrostu jonów wapniowych. Tlenek azotu pobudza GC mięśni gładkich powodując tym samym nagromadzenie cGMP. Prowadzi to do aktywacji kinazy, powodującej

defosforylację lekkich łańcuchów miozyny, a w efekcie końcowym rozkurcz mięśniówki gładkiej (9).

Z działaniem tlenku azotu rozszerzającym mięśniówkę gładką wiąże się stosowanie leków będących donorami grupy NO. Są to przede wszystkim azotany i azotyny, mające zastosowanie w chorobie niedokrwiennej serca. Do tego rodzaju leków należą: nitrogliceryna (Nitroglicerinum, triazotan glicerolu), diazotan izosorbitolu (Sorbonit) oraz tetraazotan pentaerytrolu (Pentaerithritol). Leki te poprawiają hemodynamikę w przypadku niedotlenienia mięśnia sercowego w chorobie niedokrwiennej, odciążając pracę serca i zmniejszając zapotrzebowanie na tlen.

Tlenek azotu pełni również funkcję endogennego autoregulatora przepływu krwi w mózgu, sercu, płucach, przewodzie pokarmowym i nerkach. Uwalnianie tlenku azotu do układu naczyniowego jest regulowane przez AUN. Nerwy przywspółczulne zawierające NOS kończą się w mięśniówce naczyniowej np. naczyń mózgowych czy tętnicy siatkówki (22).

Tlenek azotu oddziaływuje również na układ sercowo-naczyniowy, wywołując ujemny efekt inotropowy w komórkach mięśnia sercowego, podobny do wywieranego w komórkach mięśni gładkich.

Wiele uwagi poświęcono wpływowi tlenku azotu na śluzówkę żołądka. Wykazano, że związek ten wraz z prostaglandynami i neuropeptydami pełni funkcję ochronną wobec śluzówki żołądka, przeciw uszkadzającemu działaniu alkoholu etylowego i niesterydowych leków przeciwzapalnych.

Wiele się również mówi o udziale tlenku azotu w działaniu przeciwbakteryjnym. Stwierdzono, że tlenek azotu, a także jego prekursor L-arginina zwiększają aktywność makrofagów (8).

Istnieją dane na temat możliwości użycia tlenku azotu w leczeniu ciężkich stanów chorobowych układu oddechowego, w następstwie obniżania płucnego ciśnienia tętniczego. Przypuszczalnie wdychany tlenek azotu mógłby być użyty jako broncholityk w trakcie leczenia stanów spastycznych dróg oddechowych (1).

Jakkolwiek wiele jeszcze aspektów działania tlenku azotu nie zostało całkowicie wyjaśnionych, to jednak trzeba mieć nadzieję, że dotychczasowe dane o możliwościach farmakologicznej modulacji układu tlenku azotu w organizmie staną się w przyszłości również przydatne w farmakologii i praktyce weterynaryjnej.

Piśmiennictwo

1. *Adams H. R.*: Drugs Acting on the Autonomic and Somatic Nerves System. w: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Iowa State Univ. Press, Ames 1995, str. 78-83.
2. *Anggard E.*: Lancet 343, 1199, 1994.
3. *Baumann J. E., Persson P. B., Ehmke H., Nafz B.*: Am. J. Physiol. 263, F208, 1992.
4. *Broten T. P., Miyashiro J. K., Moncada S., Feigl E. O.*: Am. J. Physiol. 262, H1579, 1992.
5. *Bult H., Boeckxstaens G. E., Pelckmans P. A., Jordaens F. H.*: Nature 345, 346, 1990.
6. *Faraci F. M., Breese K. R.*: Circ. Res. 72, 476, 1993.
7. *Furchgott R. F., Zawadzki J. V.*: Nature 288, 373, 1980.
8. *Gross S. S., Stuehr D. A., Aisaka K., Jaffe E. A.*: Biochem. Biophys. 170, 96, 1990.
9. *Ignarro L. J., Byrns R. E., Buga G. M., Wood K. S.*: J. Pharmacol. 244, 181, 1988.
10. *Ivanova K., Schaefer M., Drummer C., Gerzer R.*: Eur. J. Pharmacol. 244, 37, 1993.
11. *Iverson L. L., Iverson S. D., Snyder S. H.*: Handbook of Psychopharmacology. Plenum, New York 1983, str. 519.
12. *Lamas S., Marsden P. A., Li G. K.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6348, 1992.
13. *Lowenstein C. J., Dinerman J. L., Snyder S. H.*: Ann. Intern. Med. 120, 227, 1994.
14. *Miki N., Kawabe Y., Kuriyama K.*: Biochem. Biophys. 75, 851, 1977.
15. *Morris S. M. jr., Billiar T. B.*: Am. J. Physiol. 266, E829, 1994.
16. *Palmer R. M. J., Rees D. D., Ashton D. S., Moncada S.*: Biochem. Biophys. 153, 1251, 1988.
17. *Parker J. L., Adams H. R.*: Circ. Res. 72, 539, 1993.
18. *Siney L., Lewis M. J.*: Eur. J. Pharmacol. 229, 223, 1992.
19. *Snyder S. H.*: Science 257, 494, 1992.
20. *Snyder S. H., Bredt D. S.*: TIPS 12, 125, 1991.
21. *Tayeh M. A., Marletta M. A.*: J. Biol. Chem. 264, 19654, 1989.
22. *Toda N., Okamura T.*: Am. J. Physiol. 259, H1511, 1990.

Adres autora: prof. dr hab. Zbigniew Roliński, ul. Weteranów 10, 20-038 Lublin

BROWNLIE J., BOOTH P. J., STEVENS D. A., COLLINS M. S.: Ekspresja niecytopatycznego wirusa biegunki bydła (BVDV) w oocytach i pęcherzykach jajnikowych bydła zakażonego trwale tym wirusem. (Expression of non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in oocytes and follicles of persistently infected cattle). Vet. Rec. 141, 335-337, 1997 (13)

Transfer zarodków od bydła zakażonego wirusem BVDV stanowi potencjalne niebezpieczeństwo rozprzestrzenienia się zakażenia na stada wolne od tego wirusa. Określono występowanie antygenu wirusowego i jego kwasu nukleinowego w oocytach i pęcherzykach jajnika u trzech krów w wieku 16-19 miesięcy trwale zakażonych wirusem BVDV. Obecność antygenu wirusowego wykazano w preparatach histologicznych sporządzonych z jajników stosując w teście immunofluorescencji przeciwciała monoklonalne dla gp 33 i p80 wirusa BVDV. Wirusowy RNA wykrywano metodą hybrydyzacji *in situ*. Ponad 18% pęcherzyków było zakażonych wirusem BVDV przy czym w ponad 6% pęcherzyków były zakażone oocyty. Zarówno w technikach zapładniania *in vitro* jak i w metodach transferu zarodków należy uwzględniać możliwość przeniesienia zakażenia wirusem BVDV.

G.

TAYLOR S. M., KENNY J., EDGAR H. W., WHYTE M.: Działanie ochronne przeciw *Dictyocaulus viviparus* u bydła w drugim roku po leczeniu doramektinem lub ivermektinem w formie kęsów. (Protection against *Dictyocaulus viviparus* in second year cattle after the first year treatment with doramectin or an ivermectin bolus). Vet. Rec. 141, 593-597, 1997 (23)

Spośród 45 cieląt w wieku około 6 miesięcy po podzieleniu na 3 grupy, grupa 1 stanowiła kontrolę, w grupie 2 zastosowano doramectin w iniekcji w dawce 200 (g/ kg w dniu 0 (utworzenie grupy) i po 56 dniach, zaś w grupie 3 zastosowano ivermektin w dniu 0 w formie kęsów. Cielęta z grupy 1 i 2 przebywały na pastwisku, na którym uprzednio przebywały cielęta zarażone pasożytami płucnymi. Dnia 229 po 5 cieląt z każdej grupy zarażano L3 *Dictyocaulus viviparus* w dawce 25 larw/kg masy ciała i ubijano po 256 i 259 dniach od początku badań określając ilość pasożytów w płucach. Ponadto w maju następnego roku cielęta zarażono w sposób identyczny jak uprzednio i ubito 398 i 401 dnia obserwacji. Obydwa leki były skuteczne. Cielęta z grupy 1 były bardziej odporne na zarażenie, z grupy 2 były mniej odporne. Jednakże te różnice nie były statystycznie istotne. Cielęta z grupy 3 były najmniej odporne na zarażenie.

G.