

12. КАСАВИНА, БК., ТОРБЕНКО, ВП. *Некоторые вопросы биохимии костной ткани в норме и патологии*. Проблемы медицинской химии. Москва: Медицина, 1973, с. 322-351;
13. КАСАВИНА, БС., ТОРБЕНКО, ВП. *Жизнь костной ткани*. М., 1979, 175 с;
14. ПРОХОНЧУКОВ, АА., ЖИЖИНА, НА., ТИГРАНЯН, РА. *Гомеостаз костной ткани в норме и при экспериментальном воздействии*. Проблемы космической биологии, 1984, Т. 49, с. 1-63;
15. РЕВЕЛЛ, ПА. *Патология кости*. Пер. с англ., М.: Медицина, 1993, 386 с.;
16. ТОРБЕНКО, ВП., КАСАВИНА, БС. *Функциональная биохимия костной ткани*. М.: Медицина, 1977, 272 с.;

**INTERPRETAREA BIOCHIMICĂ
A PLURALISMULUI DE ACȚIUNE A OXIDULUI DE AZOT
Mihail Anton, Svetlana Bobcova, Leonid Lîsîi
Catedra Biochimie și Biochimie Clinică USMF „Nicolae Testemițanu”**

Summary

Biochemical interpretation of nitric oxide pluralism of action

Nitric oxide, synthesized in vascular endothelium, macrophages, neutrophils, adrenals, cerebellum and other tissues from endogenous L-arginine and oxygen by the nitric oxide synthase, has an important role in inter- and intracellular signaling. Nitric oxide possesses a broad spectrum of biological activities, which can be conventionally classified in regulating, protective and toxic. Although the second messenger role of nitric oxide has been shown already in 1980, the molecular mechanisms by which nitric oxide exerts its biological effects are far from completely understood. This paper is a summary of the literature on mechanisms of action, biological role and involvement of nitric oxide in pathological processes.

Rezumat

Oxidul de azot, sintetizat în endoteliul vascular, macrofage, neutrofile, suprarenale, creier și alte țesuturi din L-arginina endogenă și oxigen sub acțiunea nitricoxid-sintazelor, îndeplinește un rol important în semnalizarea inter- și intracelulară. Posedă un spectru larg de acțiuni biologice, care pot fi clasificate convențional în reglatoare, protectoare și toxice. Cu toate că rolul de mesager secund al oxidului de azot a fost menționat încă din anul 1980, mecanismele moleculare prin intermediul cărora oxidul de azot își exercită efectele biologice sunt departe de a fi complet elucidate. Lucrarea reprezintă o sinteză a literaturii referitoare la mecanismele de acțiune, rolul biologic și implicarea oxidului de azot în procesele patologice.

Introducere

Oxidul de azot (NO) reprezintă un gaz incolor, greu solubil în apă, cu temperatura de topire $-163,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ și cea de fierbere $-151,7\text{ }^{\circ}\text{C}$. În ultimele două decenii a fost stabilit că această moleculă posedă un spectru vast de activitate biologică, pe care convențional îl putem împărți în reglator, protector și nociv. Oxidul de azot participă la procesele de semnalizare inter- și intracelulară. În comparație cu mediatorii clasici endocrini, paracrini și neuromediatorii, care ca regulă sunt proteine, peptide sau alte substanțe organice complexe, NO este o moleculă mică, lipsită de sarcină electrică, ceea ce îi permite să difuzeze ușor prin membranele plasmatică și în spațiile intracelulare. Traversând membrana plasmatică, NO acționează nu doar ca purtător al semnalului intercelular, dar și ca parte componentă a sistemului efector intracelular, funcționând ca mesager secund [4].

Oxidul de azot posedă un electron necuplat, ceea ce îi conferă o reactivitate chimică înaltă și îi permite să interacționeze ușor cu mulți compuși chimici și structuri celulare, fapt ce explică diversitatea excepțională a efectelor biologice produse [6].

Sinteza NO și ciclul oxidului de azot *in vivo*

Oxidul de azot poate fi sintetizat pe mai multe căi [1]. Plantele utilizează reacția fotochimică nefermentativă dintre NO₂ și carotenoide. La animale, sinteza o efectuează familia de NO-sintaze (NOS), enzime hem-purtătoare din subclasa monooxigenazelor. În dependență de structură, localizare și funcții, NOS sunt clasificate în trei grupe: endoteliale (eNOS), neuronale (nNOS) și inductibile (iNOS) [6]. Centrul activ al oricărei NO-sintaze conține complexul Fe-porfirină, ce posedă o legătură coordinativă axială cu cisteina sau metionina. Deși toate trei izoforme ale NOS catalizează formarea oxidului nitric, ele sunt codificate de gene distincte și diferă prin mecanismul de acțiune și rolul biologic. Din acest motiv e mai rațional de a le clasifica în NO-sintaze constitutive (cNOS) și inductibile (iNOS). Actualmente a fost descoperită activitate NO-sintazică și în unele celule bacteriene, inclusiv în unii agenți patogeni, cum ar fi *Bacillus anthracis* și *Staphylococcus aureus* (tabelul 1) [1]. Se presupune că NOS bacteriene (bNOS) protejează celula bacteriană de stresul oxidativ, unele antibiotice, de răspunsul imunitar.

Tabelul 1

Clasificarea, rolul și localizarea NO-sintazelor

Grupul de enzime	Reprezentantul	Gena codificatoare	Localizarea	Funcția
cNOS	eNOS	NOS ₃	endoteliu	vasodilatare
	nNOS	NOS ₁	<ul style="list-style-type: none">• țesut nervos• mușchii scheletici de tip II	comunicare intracelulară
iNOS	iNOS	NOS _{2A} , NOS _{2B} , NOS _{2C}	<ul style="list-style-type: none">• sistemul imunitar• sistemul cardiovascular	răspunsul imunitar
bNOS	bNOS	multiple	specii Gram(+)	protecție de stresul oxidativ, antibiotice și atacul imunitar

cNOS este prezentă permanent în citoplasmă, depinde de concentrația ionilor de Ca²⁺ și a calmodulinei și este capabilă să sintetizeze o cantitate mică de oxid de azot într-un timp scurt, ca răspuns la activarea a receptorilor. iNOS apare în celule doar în cazul inducției de către endotoxinele bacteriene sau unii mediatori (cum ar fi γ -interferonul, factorul de necroză tumorală etc.). Cantitatea de NO sintetizat de NOS inductibile variază considerabil și poate atinge valori destul de înalte (până la nanomoli), iar producerea poate fi de lungă durată. Reglarea activității iNOS este complexă și are loc preponderent prin feedback negativ prin produsul final. Printre stimulatorii sintezei NO menționăm: γ -interferonul, lipopolizaharidele, muramildipeptidul și interleukina-1. Inhibitorii NO-sintazelor sunt: factorul de creștere transformant- β , interleukinele 4, 8, 10 și 13, factorul de activare al macrofagelor, prostaglandina E₂, glucocorticoizii etc. [7].

NOS produc oxidul nitric prin reacția de oxidare a L-argininei, vizând 5 electroni ai azotului grupării guanidinice [4]. Schema reacției și reacțiile adiacente sunt reprezentate în fig. 1.

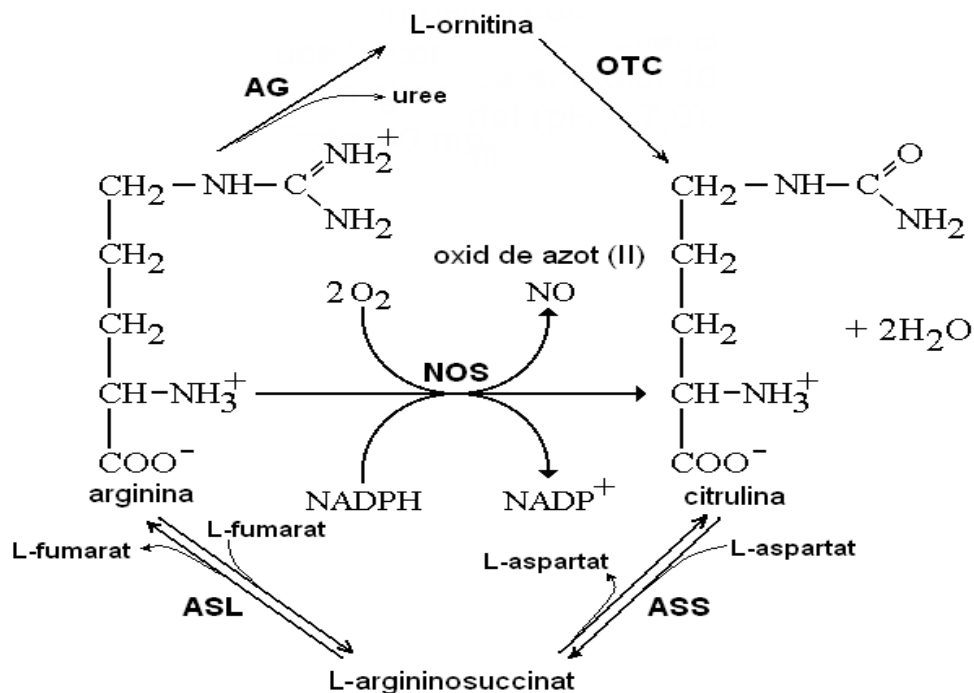


Figura 1. Sinteza oxidului de azot (II) și căile înrudite ale metabolismului

Oxidarea L-argininei în L-citrulină parcurge două reacții monooxigenazice succesive; în calitate de intermediar servește N ω -hidroxi-L-arginina (NOHLA). Astfel, la formarea unui mol de NO se consumă 2 moli de O₂ și 1,5 moli de NADPH (figura 2).

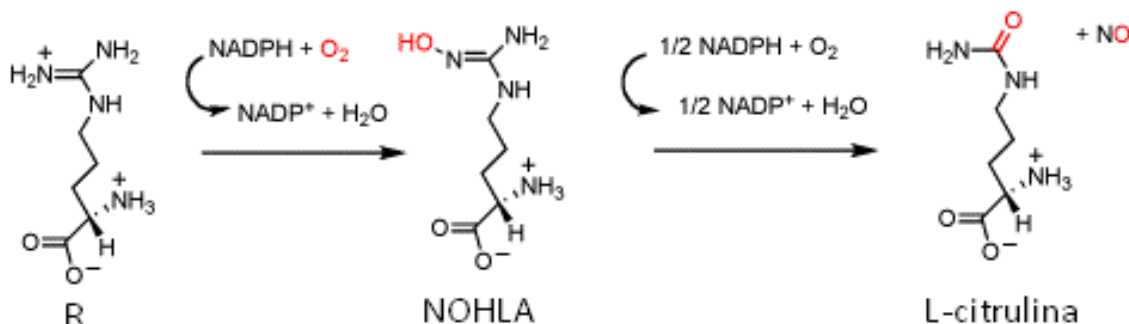


Figura 2. Reacțiile intermediare de sinteză a oxidului nitric

Odată sintetizat, NO se metabolizează destul de rapid (în mai puțin de 5 secunde) și, în funcție de calea de transformare, posedă acțiuni diferite. Totalitatea căilor de transformare a oxidului de azot în organism constituie „ciclul NO”, redat schematic în figura 3 [8].

Rolul biologic al oxidului de azot

Oxidul de azot are un spectru larg de acțiune, determinând în multe cazuri efecte diametral opuse. Ca exemplu, NO are capacitatea atât de a stimula procesele de oxidare peroxidică a lipidelor din membranele celulare, cât și de a le inhiba. Ca regulă oxidul de azot provoacă vasodilatare, însă în anumite condiții poate determina și vasoconstricție; induce apoptoza celulară, dar posedă și efect protector în apoptoza indusă de alți agenți etc. Datorită efectelor controversate, molecula dată a fost numită „Janus, cel cu două fețe” [1].

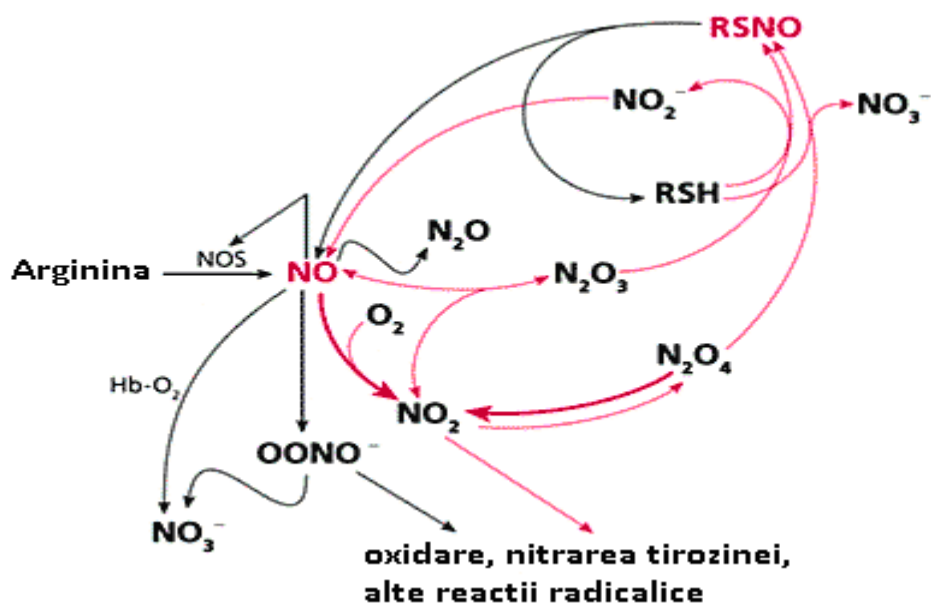


Figura 3. Ciclul oxidului de azot (II) *in vivo*

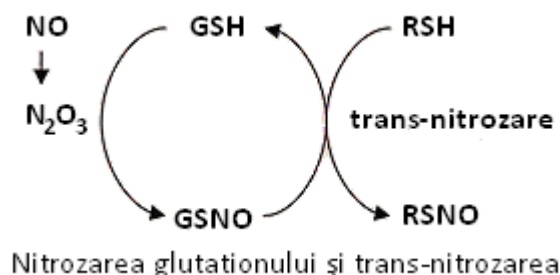
De fapt, diversitatea efectelor biologice este bazată pe complexitatea ciclului oxidului de azot și este determinată de existența multor produși ai metabolismului NO. Conform concepției ciclului oxidului de azot, acesta se poate transforma în alți compuși azotați: NO_2^- , NO_3^- , NO^+ , NO^- , radicalul ONOO^- etc., substanțe cu efecte biologice distincte [8]. Acești produși se formează în diferite condiții, sub influența diverșilor factori, de aceea, în dependență de circumstanțe, NO poate avea acțiuni distincte, inclusiv contradictorii. Momentul-cheie în transformarea oxidului de azot în alți compuși este concentrația oxigenului. În funcție de gradul hipoxiei metabolizarea NO are loc pe diferite căi, dar toate implică reacții de oxido-reducere, unde oxigenul este indispensabil.

Chiar dacă se exclud căile de acțiune a metaboliților NO, însăși oxidul de azot poate acționa prin intermediul a câtorva mecanisme:

1) Oxidarea proteinelor ce conțin Fe (hem), cum ar fi ribonucleotidreductaza, aconitaza, NADH-ubișinon-oxidoreductaza, succinat-ubișinon-oxidoreductaza, ceea ce conduce la deprimarea funcțiilor vitale ale celulei și determină acțiunea microbicidă și citotoxică a NO [1];

2) Activarea guanilatciclazei solubile, enzimă heterodimerică ce catalizează formarea GMP-lui ciclic. Acesta, la rândul său, activează proteinkinaza G, care cauzează fosforilarea fosfatazei catenei ușoare a miozinei (și inhibarea kinazei respective). Defosforilarea ulterioară a catenei ușoare a miozinei provoacă relaxarea mușchilor netezi [3, 6];

3) Nitrozilarea grupelor sulfhidrice ale proteinelor, având drept intermediar activ anhidrida azotică (N_2O_3) (figura 3). Dintre toți compușii sulfhidrici, cea mai mare concentrație o are glutathionul. Sub acțiunea NO endogen, până la 10% de glutathion se transformă în nitrozoglutation, prin intermediul căruia are loc formarea altor nitrozotioli. În plus, nitrozoglutationul poate regenera NO și, în așa mod, exercită funcția de depou al oxidului de azot [8].



În funcție de efectul produs, spectrul activității biologice a NO este divizat în trei domenii:

a) **Reglator** – în acest caz oxidul de azot se manifestă ca purtător al semnalului intercelular și ca mesager secund intracelular. La această categorie se referă următoarele efecte esențiale:

▲ Agent vasodilatator. Efectul se realizează prin activarea guanilatciclazei solubile și asigură, în cele din urmă, relaxarea mușchilor netezi ai întimei vasculare, determinând vasodilatarea. Vasodilatarea poate fi atât locală (prin activarea guanilatciclazei solubile), cât și prin intermediul SNC (prin mecanisme încă neelucidate) [2];

▲ Inhibitor al adeziunii și agregării trombocitare, chemotaxiei și adeziunii limfocitare, prin inducerea formării de cGMP;

▲ Neuromediator, cu rol important în controlul activității oscilatorii a neuronilor, în procesele de coordonare a mișcărilor și echilibrului, ca mediator al nocicepției, termosensibilității, simțului mirosului și gustului [1];

▲ Mediator în procesul de autocontrol al automatismului cardiac [2];

▲ Factor de relaxare a mușchilor netezi. Actualmente este cunoscut că NO produs de eNOS și nNOS diminuează bronhospasmul, reglează peristaltismul intestinal, relaxează sfincterele intestinului gros, participă la relaxarea uretrei, modulează peristaltica faringelui și a esofagului [3].

b) **Protector** față de diferite substanțe toxice și agenți patogeni. Se poate manifesta drept:

▲ Antioxidant – în concentrații fiziologice NO stopează derularea reacțiilor cu participarea radicalilor liberi (prin captarea acestora) și inhibă descompunerea peroxidilor. În acest caz constanta reacției NO cu radicalii peroxidici este comparabilă cu cea a α -tocoferolului, însă concentrația oxidului de azot e mai mare [7];

▲ Antiproliferativ – inhibă dezvoltarea celulelor canceroase prin mecanisme încă neelucidate. Se presupune că acest efect este legat de inactivarea enzimelor ce conțin Fe, responsabile de sinteza ATP-lui și replicarea DNA-lui, sau de lezarea directă a moleculei de DNA de către produsele de autooxidare a NO (cum ar fi peroxinitritul ONOO⁻) [5];

▲ Antimicrobian – ca parte componentă a sistemului efector al fagocitelor mononucleate. Este efectiv contra ciupercilor, virusurilor, paraziților și bacteriilor, atât extracelulare (*Shistosoma mansoni*, *Salmonella typhimurium*, *Naegleria-fowleri amoebae*, *T. muscoli*), cât și intracelulare (*Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Cryptococcus neoformans*, *Listeria monocytogenes*). Efectul antimicrobian este asigurat de nitrozilarea grupelor ce conțin Fe din centrul activ al superoxid-dismutazelor bacteriene și inducerea șocului oxidativ. Este cazul de menționat că acțiunea antibacteriană a NO este potențată în prezența produselor sale de metabolizare (NO₂⁻ și NO₃⁻) [5];

c) **Toxic** față de celulele proprii ale organismului, fapt determinat de formarea peroxinitritului, prin interacțiunea NO cu anionul superoxid [5]:



Peroxinitritul este un oxidant puternic și datorită proprietăților sale poate cauza deteriorarea unui număr apreciabil de molecule celulare, inclusiv a proteinelor și DNA-lui. Calea esențială de metabolizare a peroxinitritului este cuplarea cu bioxidul de carbon (în 2/3 din cazuri) cu formarea nitrozoperoxicarbonatului, care se descompune în CO₂ și NO₃⁻:



Însă în 1/3 de cazuri catabolismul peroxinitritului are loc pe calea formării radicalilor liberi:



Radicalul hidroxil este unul dintre cei mai nocivi compuși în organism. Spre deosebire de anionul superoxid, el nu poate fi neutralizat de superoxid-dismutază și, corespunzător, nu poate fi eliminat prin vreo reacție enzimatică [5]. Acest radical poate deteriora majoritatea

macromoleculilor: hidrații de carbon, acizii nucleici (aparitia mutațiilor), lipidele (oxidarea peroxidică a acestora), aminoacizi (ca exemplu, conversia Phe în m-Tyr sau o-Tyr). Unica măsură de protecție a celulei ar fi utilizarea antioxidanților, în special a glutationului. Însă glutationul este din start inactivat de peroxinitrit, cu formarea radicalilor tiolici ai glutationului (GS·), ceea ce favorizează derularea stresului oxidativ și, implicit, a apoptozei celulare.

Implicarea în geneza proceselor patologice

Datorită diversității efectelor biologice provocate de către oxidul de azot (II), implicarea sa în geneza proceselor patologice are loc în două cazuri: insuficiență sau supraproducție de NO:

1. Diminuarea producerii de NO are următoarele consecințe:

▲ Hipertensiunea arterială cauzată de creșterea tonusului bazal al vaselor și de vasoconstricție. Menționăm că în caz de insuficiență renală cronică crește concentrația plasmatică a dimetilargininei, ceea ce provoacă inhibarea competitivă a NO-sintazelor. Posibil aceasta ar fi cauza apariției hipertensiunii arteriale din insuficiența renală [2];

▲ Creșterea riscului aterogen. Factorii de risc cardiovascular (hiperlipoproteinemia, diabetul zaharat, fumatul etc.) dereglează funcționalitatea endoteliului și micșorează sinteza NO, ceea ce conduce la creșterea tonusului vascular, diminuarea activității sistemului anticoagulant, sporirea proliferării celulare, creșterea permeabilității vasculare etc. [2];

▲ Se presupune că o serie de maladii ale tractului gastro-intestinal (boala Hirschprung, acalazia esofagiană, pseudoobstrucția intestinală cronică) sunt cauzate de micșorarea numărului de neuroni intramurali care sintetizează NO.

2. Sporirea sintezei de NO poate avea loc în cazul activării iNOS, cu numeroase consecințe:

▲ În caz de sepsis endotoxinele și citokinele induc NO-sintaza, ceea ce se soldează cu creșterea concentrației NO și, ca consecință, cu apariția hipotoniei arteriale și a hipocoagulabilității;

▲ În concentrații mari NO are acțiune toxică asupra SNC – are loc lezarea celulelor nervoase și eliberarea unei cantități mari de L-glutamat, care induce și mai mult formarea NO [1].

Bibliografie

1. Butler A. and Nicholson R. Life, death and NO. Cambridge, 2003.
2. Dessy C., Ferron O. Pathophysiological Roles of Nitric Oxide: In the Heart and the Coronary Vasculature. Current Medical Chemistry – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Bentham Science Publishers Ltd.). 2004, p. 207–216.
3. Howard K. Surks. cGMP-Dependent Protein Kinase I and Smooth Muscle Relaxation: A Tale of Two Isoforms. Circ. Res., 2007.
4. Ignarro L.J. Nitric Oxide. A Novel Signal Transduction Mechanism For Transcellular Communication. 2001.
5. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite: in Health and disease Physiological Reviews. 2007, vol. 87(1), p. 315–424.
6. Taqatqeh F., Mergia E., Neitz A., et al. More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. The Journal of Neuroscience, 2009, no. 29, p. 9344-9350.
7. Tylor B.S., Kion Y.M., Wang Q.I., et al. Nitric oxide down regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. Arch. Surg., 1997, no. 1(32), p. 1177–1182.
8. Van Faassen, E.E.; Vanin A.F. (eds); Radicals for life: The various forms of Nitric Oxide. Elsevier, Amsterdam, 2007.
9. Wink D.A., et al. DNA deamination ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science, 1991, no. 254, p. 1001-1003.