

УЛОГА АЗОТ МОНОКСИДА У ФИЗИОЛОШКИМ ФУНКЦИЈАМА И ПАТОЛОШКИМ СТАЊИМА

Кисић Божовић Б., Мирић Д., Драгојевић И.

Институт за биохемију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

THE ROLE OF NITRIC OXIDE PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL PROCESSES

Кисић Божовић Б., Мирић Д., Драгојевић И.

Institute of biochemistry, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

Nitric oxide (NO) is a major messenger molecule that plays key roles in many physiological processes. NO is produced by nitric oxide synthase (NOS), which catalyzes the conversion of L-arginine to L-citrulline and NO. At least three isoforms of NOS have been identified and characterized, namely, neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS (iNOS). Recent evidence indicates that most of the cytotoxicity attributed to NO is rather due to peroxynitrite, produced from the diffusion controlled reaction between NO and another free radical, the superoxide anion. Peroxynitrite interacts with protein, DNA and lipids via direct oxidative reactions or via indirect radical mediated mechanisms.

Key words: Nitric oxide, Nitric oxide synthase, Peroxynitrite.

САЖЕТАК

Азот-моноксид (NO) је интерцелуларни месинџерни молекул, сматра се регулатором многих физиолошких функција у организму, али и значајним медијатором укљученим у молекулске механизме настанка бројних патолошких стања. Азот моноксид се синтетиче из L-аргинина под каталитичким дејством азот-моноксид синтазе. Постоје три изоформе ензима азот-моноксид синтазе (NOS): nNOS (NOS-1) неуронална, iNOS (NOS-2) индукцибилна и eNOS (NOS-3) ендотелна. Пошто има неспарени електрон, NO може брзо да реагује са O_2^- који се ствара у интрацелуларној и екстрацелуларној средини, при чему се продукује пероксинитрит (ONOO⁻). Створени пероксинитрит реагује са бројним биомолекулима, делујући као селективни оксидант и нитришући агенс.

Кључне речи: Азот моноксид, Азот моноксид синтаза, Пероксинитрит.

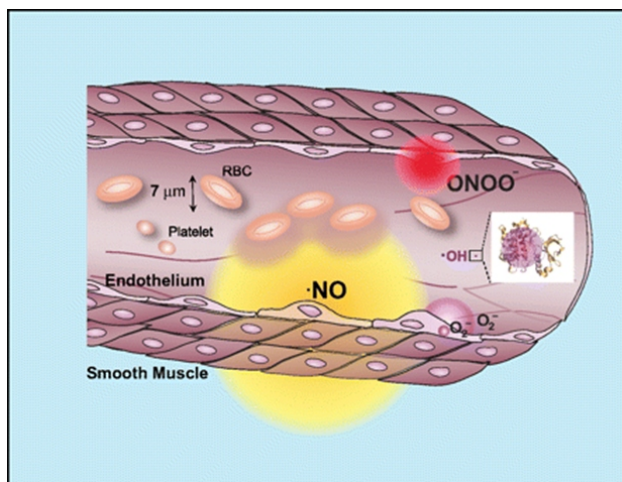
УВОД

Азот-моноксид (NO) је интерцелуларни месинџерни молекул, сматра се регулатором бројних физиолошких функција у организму, али и значајним медијатором укљученим у молекулске механизме настанка бројних патолошких стања.

Испитивања везана за NO почела су пре двадесетак година, када су 1980. године Furchgott i Zawadzki (12) утврдили да васкуларни ендотел продукује једну непостојану супстанцу, која је одговорна за вазодилатацију изолованих крвних судова и увели су термин “ендотелни фактор релаксације” (“endothelium-derived relaxing factor”). Неколико година касније Moncada и сарадници (1988. год.) (28), су доказали да ендотелне ћелије у култури синтетичу азот моноксид, који је фармаколошки идентичан са “ендотелним фактором релаксације”. Даља истраживања су показала да се азот моноксид може синтетисати и у глаткомишићним ћелијама васкулатуре (25), централном нервном систему (17), неутрофилима, активисаним макрофагима (31), Купферовим ћелијама, надбубрежној жлезди.

Азот-моноксид, са молекулском масом 30, је најмањи ћелијски сигнални медијатор. NO је хемијски нестабилан, кратког полуживота (6-60 s), али *in vivo* може да формира S-nitroso спојеве, па у крви циркулише у виду S-nitroso albumina (36), што продужава његову биолошку активност на 1-2 минута. Он је реактиван молекул липофилне природе, брзо дифундује кроз ћелијске мембране, лако реагује са сулфхидрилним групама биомолекула и јонима метала, што му омогућава да утиче на бројне биолошке функције у организму.

NO је нестабилан, брзо се разграђује до стабилних продуката нитрата и нитрита. У циркулацији NO одмах реагује са оксихемоглобином (20), при чему настају метхемоглобин и нитрати (Слика 1) (31). Сматра се да се највећа количина створеног NO конвертује у нитрате, који се могу одређивати у плазми и сматрају се мером продукције азот-моноксида.



Слика 1. - NO веома брзо дифундује из ткива у еритроците, где се конвертује у нитрате у реакцији са оксидохемоглобином. На слици је приказана дифузија NO, супероксид анјон радикала (O_2^-), пероксинитрита ($ONOO^-$) и OH радикала.

(Pacher P, Beckman J, Liandet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*, 2007; 87: 315-424).

Синтеза азот монооксида

Азот монооксид се синтетише из L-arginina под каталитичким дејством азот- монооксид синтазе (NOS, EC 1.14.13.39), која катализује реакцију L-arginina, NADPH и кисеоника, при чему као производи настају NO, citrulin и NADP (шема 1).

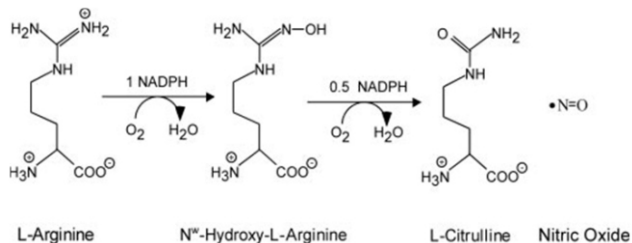


Схема 1. - Пут синтезе азот-монооксида.

(Stueli DJ, Santolini J, Wang ZhQ, Wei ChCh, Adak S. Update on Mechanism and Catalytic Regulation in the NO Synthases. *The J of Biol Chem* 2004; 279(35): 36167-36170).

Постоје три изоформе ензима азот-монооксид синтазе (NOS): nNOS (NOS-1) *неуронална*, iNOS (NOS-2) *индуцибилна* и eNOS (NOS-3) *ендотелна* (1,34). Ендотелна и неуронална изоформа су нормални састојци ћелија, док се индуцибилна NOS не налази у здравим ћелијама, већ се индукује у ендотелним, глаткомишићним, имуним ћелијама и миоцитима, дејством цитокина или бактеријских ендотоксина (13). Све три изоформе садрже хем и везујућа места за L-arginin, калцијум-калмодулин, NADPH, флавин нуклеотиде (FAD i FMN) и тетрахидробиоптерин (BH_4), имају сличан афинитет према L-argininu и не користе D-arginin као супстрат. Везивање калмодулина је веома значајно за активност NOS. Везивање калмодулина за конститутивне форме NOS омогућавају јони калцијума и зато је њихова активност регулисана нивоом интрацелуларног калцијума.

Неуронална (nNOS) и ендотелна (eNOS) изоформа су конститутивне изоформе NOS, калцијум-зависне су и локализоване су у ендотелним ћелијама, тромбоцитима и нервном ткиву (1). Дејством конститутивних изоформи NOS настају краткоживећи (секунде/минуте) NO молекули (24). Поред катализе основне (базалне) синтезе азот-монооксида, која се врши под утицајем вазоконстрикције, конститутивне форме NOS катализују и синтезу NO под дејством различитих стимулуса, физичке и хемијске природе. Главни физиолошки стимулус је брз пораст крвног протока. Велики број ендогених и екзогених супстанци изазива ендотел-зависну релаксацију глатких мишића крвних судова. Ослобађање азот-монооксида услед хемијске стимулације, врши се активацијом бројних рецептора (адренергичних, серотонинергичних, хистаминергичних, брадикининских и естрогених) (5). Вазодилаторни агенси, као што су ацетилхолин, АТФ и брадикинин, иницирају рецептором посредовани инфлукс калцијума, што доводи до продукције и екстрацелуларног ослобађања азот-монооксида.

Индукцибилна NOS је калцијум-независна изоформа. Индуцију њене експресије стимулишу цитокини и други инфламаторни стимулуси (32), као што су бактеријски производи: липополисахариди и леукотријени (22). Индуцибилна NOS може продуковати азот-оксид током дугог периода (сатима и данима), након иницијалног периода потребног за синтезу протеинског молекула ензима.

Настали азот монооксид, иако краткоживећи молекул, секундарни је гласник који пролази мембране, активира биохемијске процесе у суседним ћелијама и остварује улогу интерцелуларног месенџера.

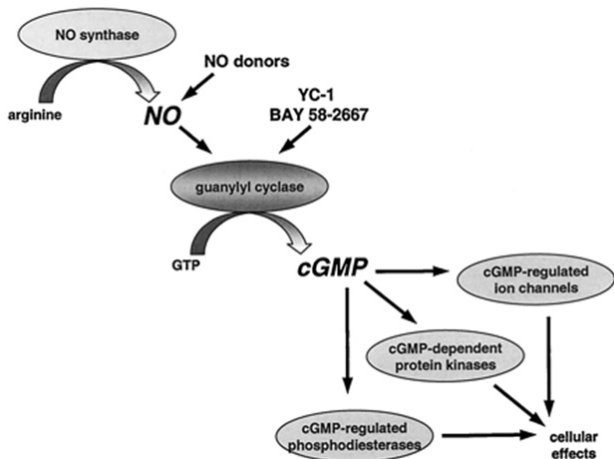
Биолошки значај NO

Биолошки значај NO у организму је детерминисан његовим реакцијама са таргет (циљним) молекулима, које су зависне од биохемијског окружења, а биолошка реактивност овог медијатора се састоји из: реакције азот монооксида са хемоглобином, активације гванил циклазе, интеракције са тиол групама и трансформације у пероксинитрит.

Један од основних метаболичких путева ендогеног азот монооксида, је реакција NO са хемом хемоглобина (слика бр.1). После синтезе, азот монооксид дифундује у циркулацију, где у артеријској крви (у аеробним условима), реагује са оксидохемоглобином, при чему настају нитрати и метхемоглобин (20,16). У анаеробним условима реагује са деоксидохемоглобином, формирајући нитрозилисани хемоглобин.

Азот-монооксид своју активност остварује стимулацијом ензима гванил-циклазе (11,27), што доводи до пораста нивоа с-GMP у различитим ткивима. Азот-монооксид, који се синтетише и ослобађа из одговарајуће ћелије, реагује са хемом (простетична група) гванилциклазе, градећи комплекс који условљава активацију овог ензима. Активирани ензим катализује производњу цикличног гванозин-монофосфата (сGMP) из гванозин-трифосфата (GTP). Циклични-GMP је интрацелуларни месенџер који иницира бројне ћелијске функци-

је: активира cGMP-зависне протеин киназе (медијаторе ћелијске сигнализације) и врши фосфорилацију различитих ћелијских протеина. Такође, c-GMP контролише и активност фосфодиестераза, које регулишу трајање и амплитуду ћелијске сигнализације посредоване цикличним нуклеотидима (11,35) (слика 2).



Слика 2. - NO/cGMP сигнална каскада. cGMP као интрацелуларни месенџер утиче на активност cGMP зависне киназе, утиче на cGMP зависне јонске канале и утиче на фосфодиестеразе.

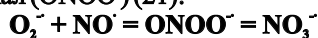
(Friebe A. Koeslin D. Regulation of Nitric Oxide Sensitive Guanylyl Cyclase. Circ Res, 2003, 93:96).

Азот моноксид може да нитрозилише тиол групе, при чему се конвертује у нитрозојон (NO⁺). Овај јон затим реагује са тиол групама, стварајући нитрозо-тиоле (19), који могу да преносе NO⁺ групу на друге сулфидрилне групе target протеина, формирајући стабилније ковалентне везе. Настали нитрозотиоли се сматрају депоима и транспортним обликом NO, који су значајни за доступност азот монооксида у другим метаболичким путевима у организму.

Метали са променљивом валенцом су, такође биолошке "мете" за NO, при чему настају NO-метал комплекси. Један од таквих метала је гвожђе, уграђено у молекуле хема.

У остваривању биолошких улога NO важну улогу имају и његови деривати: азот-диоксид (NO₂), пероксинитрична киселина (ONOOH), пероксинитрит (ONOO⁻) и азот-триоксид (N₂O₃) (31).

У реакцији са молекулским кисеоником (O₂) NO се конвертује у азот диоксид. Брзина ове реакције је велика у гасној фази, док у биолошким системима азот моноксид међутим, пре реагује са супероксид анјон радикалом (O₂⁻), стварајући снажни оксидант, пероксинитритни радикал (ONOO⁻) (21):

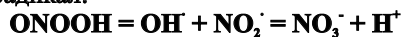


Пошто има неспарени електрон, NO може брзо да реагује са O₂⁻ који се ствара у интрацелуларној и екстрацелуларној средини, при чему се продукује пероксинитрит (ONOO⁻). Брзина ове реакције је три пута већа од

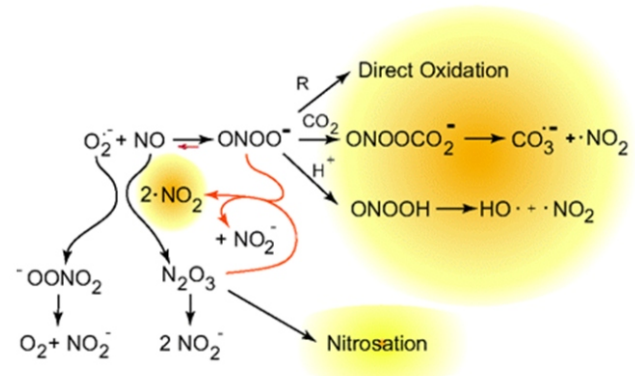
оне којом супероксид дизмутаза катализује дизмутацију O₂⁻ у водоник пероксид. Створени пероксинитрит реагује са бројним биомолекулима, делујући као селективни оксидант и нитришући агенс. Он врши нитровање тирозина и тирозинских остатака, стварајући нитротирозин. Коришћењем антитела на нитротирозин откривено је да су реакције нитровања укључене у молекулске механизме патогенезе атеросклерозе, амиотрофичне латералне склерозе и других болести.

Екстрацелуларна супероксид дизмутаза има функцију да лимитира реакцију NO са O₂⁻ (30). Азот-моноксид се не везује директно за бакар SOD, то значи да је стабилизација NO у присуству SOD, последица дизмутације O₂⁻ (9).

Пероксинитритни радикал (ONOO⁻) се брзо протонује у пероксинитритну киселину, која се даље разлаже на врло реактивни хидроксилни радикал и азот-диоксид радикал:



Токсичност азот-монооксида потиче из могућности продукције хидроксилног радикала (OH), чији је директни прекурсор пероксинитрит (Слика 3). Има података који показују да пероксинитрит преко оксидационог стреса доводи до фрагментације протеина и инактивације значајних регулаторних протеина.



Слика 3. - Приказана је улога NO, супероксид анјон радикала (O₂⁻), пероксинитрита (ONOO⁻) и азот диоксида (NO₂), где NO и O₂⁻ радикал могу реаговати са NO₂, при чему настају азот триоксид (N₂O₃) и пероксинитрит. Даље ONOO⁻ може реаговати са тиолима, дајући нитрозотиоле или са хидроксилним анјоном дајући нитрите.

(Pacher P, Beckman J, Liandet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiol Rev, 2007; 87: 315-424).

Многи биолошки системи су осетљиви на продукцију система азот-моноксид/пероксинитрит, која се сматра значајним патогенетским фактором неуродегенеративних болести, укључујући и мултиплу склерозу (8). Реактивни пероксинитритни анјон испољава цитотоксичне ефекте оксидацијом сулфидрилних група (протеинских и непротеинских) у ћелијама различитих ткива (19) и оксидацијом дезоксирибозе до MDA.

Азот-моноксид је веома осетљив на инактивацију супероксид анјон радикалом, али ова реакција може бити и корисна јер повећава бактерицидни капацитет.

тет макрофага и неутрофила (33,37), а такође је значајна уколико се жели заустављање вазодилаторског или неуротрансмитерског сигнала азот-монооксида и његових деривата излучених у екстрацелуларни простор. Због тога је добра контрола супероксид анјон радикала, помоћу екстрацелуларне супероксид димутазе (EC-SOD) значајна у екстрацелуларним просторима, где се остварује интерцелуларни сигнални процес помоћу азот-монооксида и његових интермедијата. Супероксид анјон радикал је примарни scavenger азот-монооксида и на тај начин може потпуно редуковати његове ефекте у било ком сигналном систему организма. То указује на велики значај EC-SOD, која регулацијом концентрације екстрацелуларног супероксид анјон радикала (O_2^-) утиче на медијаторску улогу азот-монооксида.

Могућност да реагује са бројним таргет молекулама, интеракција створених метаболита, као и њихов утицај на бројне метаболичке путеве објашњава читав низ биолошких ефеката азот монооксида као сигналног молекула.

Механизам деловања азот монооксида зависи од таргет ћелије. Зависно од услова у којима се ствара NO и његов продукт пероксинитрит, могућа је активација бројних метаболичких путева, што резултира или адаптацијом ћелије на стимулус или иницијацијом апоптозе, програмирање ћелијске смрти. Бројна су истраживања механизма ћелијске смрти индуковане азот монооксидом и постоје докази да оштећење DNK изазвано пероксинитритом, смањује ниво NAD-a, што доводи до ћелијске смрти (7). Ћелија изложена утицају NO и пероксинитрита, вероватно сама одређује своју судбину, на основу доступности протеина који реагују са њима и постојећих механизма "одбране" од оштећења протеина, нуклеинских киселина, липида и др. компоненти ћелије. У условима поремећених механизма одбране и деловања високих концентрација NO, азот моноксид може узроковати оксидативни или нитрозативни стрес.

Биолошки ефекти NO

Азот моноксид је у ствари, молекула преноса у нервном систему ("messenger molecule"), али има функције и у другим ткивима. Као интерцелуларни сигнални молекула, утиче на низ физиолошких функција у организму: делује у регулацији васкуларног тонуса (медијатор је вазодилације) (25), мотилитета црева, утиче на агрегацију и адхезију тромбоцита (смањује агрегацибилност тромбоцита) (14), пролиферацију, апоптозу (7) и неуротрансмисију (17).

Директни ефекти иницирани азот-монооксидом су: релаксација глатких мишића васкулатуре, васкуларни пермеабилитет, инхибиција адхезије и агрегације тромбоцита, модулирање леукоцит-ендотелне интеракције, митогенеза и пролиферација фибробласта и глаткомишићних ћелија крвних судова. Како адхезија тромбоцита и леукоцита за ендотел крвних судова учествује у развоју атеросклерозе, логично је да хронична инхибиција азот-монооксид синтазе убрзава прогресију атеросклеротичних промена.

Синтеза азот-монооксида у ЦНС-у се одвија у неуронима, глијалним ћелијама (астроцити, олигоден-

Табела 1. - *Могуће физиолошке улоге азот-монооксида.* (Ђорђевић V, Павловић D, Кочић G. Biohemija slobodnih radikala 2000; Medicinski fakultet Niš)

- Периферна васкулатура	- Вазодилација крвних судова и регулација крвног притиска
- Циркулишуће ћелије	- Инхибиција адхезије тромбоцита и леукоцита за ендотел и инхибиција агрегације тромбоцита
- Срце	- Редукција контрактилности миокарда
- Бубрези	- Регулација реналног васкуларног отпора и екскреције натријума
- Нервни систем	- Учествује у памћењу, перцепцији бола, messenger molecule
- Гастроинтестинални тракт	- Врши неуротрансмисију и неадренергично нехолинергично-посредовану релаксацију глатких мишића
- Ендокрини систем	- Мења секрецију инсулина и ренина
- Имуни систем	- Доприноси отпорности

дроцити и микроглија) (29) и у ендотелним ћелијама, под каталиничким утицајем Ca²⁺/калмодулин зависне nNOS. Деполаризацијом пресинаптичких експитаторних неурона, коју прати отварање волт-сензитивних калцијумових канала, омогућава се улаз јона калцијума у пресинаптички неурон. Везани за специфични протеин калмодулин, калцијумови јони активирају одговарајуће протеин киназе које покретањем фосфорилације протеина омогућавају ослобађање глутамата. Ослобођени глутамат преко активације постсинаптичких јонотропних и метаболотропних рецептора, од којих је најважнији N-metil-D-aspartat (NMDA) рецепторски комплекс(8), условљава отварање јонских канала и активирање fosfolipaze C. Оба механизма резултирају повећањем интраћелијске калцијумове сигнализације у постсинаптичком неурону, који се везује за калмодулин и активира се неуронална NOS, која конвертује L-arginin до цитрулина и NO (17). Створени NO слободно дифундује према циљним неуронима и циљном супстрату гванил циклази. Активирана гванил циклаза катализује производњу cGMP из cGTP. Настали cGMP активира одређене протеин киназе, које фосфорилацијом протеина, укључујући протеинске омотаче мехурића у којима је депонован глутамат, омогућава ослобађање новог пакета глутамата.

У ЦНС-у NO делује као као универзални модулатор бројних физиолошких функција, укључујући интернеуронске комуникације, синаптичку сигнализацију, стварање меморије, функцију рецептора, интраћелијску сигнализацију и ослобађање неуротрансмитера (17). NO своје биолошко дејство не остварује везивањем за рецепторне протеине на мембранама удаљених локуса, већ дифундује од неурона до неурона делујући директно на интрацелуларне компоненте. За разлику од конвенционалних неуротрансмитера чија се активност завршава или механизмом преузимања или ензимском

деградацијом, активност NO се завршава његовом хемијском реакцијом са target једињењима, интензитетом који зависи од њихове доступности и његовог афинитета према овим молекулима (8).

Азот-моноксид синтаза (nNOS) у ЦНС-у осим, што има улогу физиолошког регулатора, може допринети и смрти неурона. Старење, и неуродегенерација (6) код Parkinsonove i Alzheimerove болести су такође повезани са цитотоксичношћу и оксидативним оштећењем, насталог због нитровања протеина. Ван физиолошких оквира, у ЦНС-у NO се ослобађа због индукције iNOS у инфламацији и након пролазних периода исхемије (3) из активираних глијалних ћелија (астроцити, олигодендрцити и микроглија), као и фагоцита и васкуларних ћелија. Golde и сар. (15) су коришћењем специфичних инхибитора за iNOS и nNOS, показали да је NO пореклом из микроглије важан за остваривање ефеката неуротоксичности и да је интензивна продукција NO у ћелијама глије укључена у патогенезу мултипле склерозе, Huntingtonove, Parkinsonove i Alzheimerove болести, инзулта и амиотрофичне латералне склерозе (6,8,15,27).

Оштећење митохондрија је важан фактор у неуродегенеративним болестима, а деривати NO су значајни медијатори овог оштећења. Многи литературни подаци указују да оштећење ћелија, изазвано азот-моноксидом, настаје првенствено због стварања пероксинитрита и последичног нитровања протеина (2).

Азот-моноксид и његови метаболити могу деловати на функцију митохондрија на више нивоа: NO повећава пермеабилност митохондрија што резултира смрћу неурона (4). Ћелије стимулисане цитокинима продукују азот-моноксид, који инхибира процес ћелијског дисања у митохондријама, што доводи до поремећаја енергетског метаболизма у неуронима (18) и блокаде аксоналне проводљивости и сматра се једним од главних узрока ћелијске смрти индуковане азот моноксидом.

Азот-моноксид у васкуларном ткиву има вазодилататорну улогу тј. он је прво и идентификован као дифузибилни фактор, који се ослобађа локално у одговору на вазодилататорне супстанце. Разни локални или циркулишући неурохуморални фактори, хормони и хидромеханички стрес индукују активацију синтезе NO у ендотелним ћелијама (25,35). И ова функција азот оксида се остварује преко активације гванил циклазе, производње cGMP, активирања одговарајућих протеин киназа (26), покретања фосфорилације протеина у мишићном слоју крвних судова, конкретно лакних ланаца миозина. Крајњи резултат је релаксација глатких мишића крвних судова тј. вазодилатација.

Азот-моноксид има и антиагрегационо дејство на тромбоците. NO формиран у ендотелним ћелијама, индукцијом различитих стимулуса, дифундује у лумен крвног суда (Слика 1), где продире у тромбоците, нарочито оне у близини ендотелне површине (14). У тромбоцитима азот-моноксид стимулише гванил циклазу, што резултира повећањем концентрације cGMP и смањењем интратромбоцитног садржаја јона калцијума. Ови процеси спречавају адхезију и агрегацију тромбоцита, а тиме формирање тромба у циркулацији и настајање вазоспазма.

Бројни експериментални подаци указују да се азот-моноксид и његови реакциони продукти укључују и у антимикуробну активност (38). Инхибитори iNOS могу блокирати антимикуробну или антивирусну активност in vitro. Трансфекција ћелија са iNOS или прекурсорима азот-моноксида повећава отпорност на инфективне агенсе. Улогу азот-моноксида, односно његових реакционих продуката, у контроли инфекције потврђују и експерименти на мишевима у којима постоји генетички дефект iNOS, што доводи до смањене способности контроле инфекција у односу на дивљи тип миша (23).

Цитотоксично дејство макрофагног NO на таргет ћелије тумора, је ефекат NO независан од cGMP-а (9). Овај антитуморски ефекат се вероватно остварује преко нитрозилације и последичне инактивације ензима таргет ћелија, који садрже метале са променљивом валенцом, као што је гвожђе.

Преко неуроналних структура азот оксид у цревима учествује у регулацији мишићног тонуса, у релаксацији црева. Ову функцију NO обезбеђује преко инхибиторних моторних неурона, који инервишу унутрашњи циркуларни мишићни слој црева.

ЗАКЉУЧАК

Може се рећи да азот моноксид представља јединствени биоактивни молекул. У физиолошким условима има неуромодулаторну функцију у ЦНС-у, медијатор је регулације васкуларног тонуса и инхибитор агрегације тромбоцита, као и медијатор цитотоксичних ефеката активираних макрофага. У патолошким условима, у условима интензивне производње, азот моноксид може бити фактор цитотоксичности у неуродегенеративним и разним другим обољењима. Азот моноксид, структурно једноставан, а функционално сложен молекул, који испољава вишеструке и често парадоксалне ефекте у организму, представља и даље предмет бројних истраживања и упознавања његових цитопротективних и цитотоксичних улога.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alderton W, Cooper ChE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
2. Almeida A, Bolanos JP. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* 2001; 77: 676-90.
3. Bachschmid M, Thureau S, Zon MH, Ullrich V. Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation. *FASEB J* 2003; 17: 914-916.
4. Borutaite V, Morkumiene R, Brown GC. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms. *FASEB Lett* 2000; 467: 155-9.
5. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999; 103: 401-406.

6. Chung KK, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide, s-nitrosylation and neurodegeneration. *Cell Mol Biol* 2005; 51: 247-254.
7. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 2002; 158: 507-17.
8. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J of Chem Neuroanat* 1996; 10: 179-190.
9. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Biohemija slobodnih radikala 2000; Medicinski fakultet Niš.
10. Fleming J. The Neuronal Nitric Oxide Synthase as a Regulator of Myogenic Tone. *Circ Res* 2003; 93: 586.
11. Friebe A, Koeslin D. Regulation of Nitric Oxide - Sensitive Guanylyl Cyclase. *Circ Res* 2003, 93:96.
12. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
13. Gautier C, Negrerie M, Wang ZhQ, Lambry JCh, Stuelu DJ, Collin F, Martin JL, Schwob AS. Dynamic Regulation of the Inducible Nitric-oxide Synthase by NO. *J Biol Chem* 2004; 279 (6): 4358-65.
14. Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet Derived Nitric Oxide Signaling and Regulation. *Circ Res* 2007; 101: 654-662.
15. Golde S, Chandran S, Brown GC, Compston A. Different pathways for iNOS-mediated toxicity in vitro dependent on neuronal maturation and NMDA receptor expression. *J Neurochem* 2002; 82: 269-82.
16. Gow AJ, Luchsinger BP, Pawloski JP, Singel DJ, Stamler JS. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9027-32.
17. Guix FX, Urbesalgo I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 2005; 76: 126-152.
18. Heales SJ, Bolanos JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410: 215-28.
19. Hogg N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radic Biol and Med* 2000; 28 (10): 1478-86.
20. Joshi MS, Ferguson TB Jr, Han TH, Hyduke DR, Liao JC, Rassaf T, Bryan N, Felisch M, Lancaster JR Jr. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10341-346.
21. Kelm M, Dahmann R, Wink D, Feelish M. The Nitric Oxide/Superoxide Assay. *The J of Biol Chem* 1997; 272(15): 9922-32.
22. Larfars G, Lantoine F, Devynck MA, Palmblad J, Gyllenhammar H. Activation of Nitric Oxide Release and Oxidation Metabolism by Leukotriens B₄, C₄ and D₄ in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Blood* 1999; 93: 1399-1405.
23. Lefler DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R. Leukocyte endothelial cell interactions in nitric oxide synthase - deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999, 276 (6): H1943-H1950.
24. Lopez-Figueroa MO, Caamano C, Marin R, Guerra B, Alonso R, Morano IM, Akil H, Watson SJ. Characterization of basal nitric oxide production in living cells. *Biochim et Biophys Acta* 2001; 1540: 253-264.
25. Lundberg JO, Weitzberg E. NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control. *Atheroscl, Thrombosis and Vasc Biol* 2005, 25: 915-936.
26. Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Protein Kinase C. *J Biochem* 2003; 133(6): 773-81.
27. Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem* 2006; 97: 1676-89.
28. Moncada S, Radomski MW, Palmer RMJ. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988b; 37: 2495-2501.
29. Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells. *Glia* 2000; 29: 1-14.
30. Nauser T, Koppenol WH. The rate constant of the reaction of superoxide with nitrogen monoxide: approaching the diffusion limit. *J Phys Chem A* 2002; 106: 4084-4086.
31. Pacher P, Beckman J, Liandet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424.
32. Rao KM. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2000; 3: 27-58.
33. Rodenas J, Mitjavila MT, Carbonell T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998 274: C827-C830.
34. Stuelu DJ, Santolinis J, Wang ZQ, Wei ChCh, Adak S. Update on Mechanism and Catalytic Regulation in the NO Synthases. *J Biol Chem* 2004; 279 (35): 36167-36170.
35. Toda N, Okamura T. The Pharmacology of Nitric Oxide in the Peripheral Nervous System of Blood Vessels. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 271-324.
36. Wang X, Santos TJE, Reiter DCh, Dejam A, Shiva S, Smith RD, Hogg N, Gladwin MT. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. *PNAS* 2004; 101 (31): 11477-482.
37. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6954-6958.
38. Zweier JL, Xia Y. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6954-6958.