

TIPTA YENİLİKLER

Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri

NITRIC OXIDE (NO•) AND NITRIC OXIDE SYNTHASE (NOS): PHYSIOLOGIC AND PATHOLOGIC CHARACTERISTICS

Dr. Mustafa B. ÇEKMEN*, Dr. Mehmet TURGUT**, Dr. Yusuf TÜRKÖZ***,
Dr. A. Denizmen AYGÜN****, Dr. Engin M. GÖZÜKARA*****

* Uz., İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, MALATYA
** Yrd.Doç., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hast. AD, ELAZIĞ
*** Yrd.Doç.Dr., İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, MALATYA
**** Doç.Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hast. AD, ELAZIĞ
***** Prof.Dr., İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, MALATYA

Özet

Nitrik oksit (NO) son yıllarda tanınan, birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. Önceleri vasküler sistemde, endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak tanımlandı. NO ve diğer bir son ürün olan sitrullin, argininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. NOS'in genetik olarak farklı üç izoformu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarda üretilerek vasküler tonüsü ayarlayan bir konstitütif endotelial izoform (eNOS), yine düşük miktar üretilen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen bir konstitütif nöronal izoform (nNOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir form (iNOS)'dur. nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için Ca^{++} kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşın iNOS bundan bağımsızdır.

NO fizyolojik konsantrasyonlarda, hemen hemen tüm organ sistemlerde değişik biyolojik etkilere sahiptir. NO gastrointestinal sistem, havayolları, kavernoöz dokulardaki vasküler düz kasların gevşemesinde önemli bir mediyatördür. NO merkezi sinir sisteminde, hafızanın şekillenmesini de içeren çeşitli fonksiyonları bir nörotransmitter olarak destekler; Periferde ise gastrointestinal, solunum ve genitouriner sistemle ilgili çeşitli fonksiyonları düzenler. İlave olarak NO'nun, konak savunması ve immunolojik reaksiyonlarda da fonksiyonu vardır. Miyokard fonksiyon bozukluğu, dolaşım yetmezliği ve farklı organ disfonksiyonu ile sonlanan durumlara, artmış NO formasyonunun katkısı olabilir. Diğer taraftan artmış NO vazodilatasyona, trombosit yapışmasının engellenmesi ile dokuların mikrosirkülasyonunda rahatlamaya ve sonuçta da dokuların oksijenlenmesi yönünde çok yararlı katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Nitrik oksit, Nitrik oksit sentaz, NOS

T Klin Pediatri 2001, 10:

Summary

Nitric oxide (NO) is a recently recognized, very short-lived free radical with important roles in a number of biological processes. At first it was identified as an endothelium-derived relaxing factor (EDRF) in vascular system. NO biosynthesis occur from arginine by NO synthase (NOS) and the other end product is citrulline. Three genetically distinct NOS isoforms have been identified. These includes a constitutive, low output endothelial isoform (eNOS) that modulates vascular tone, a neuronal isoform (nNOS) that modulates synaptic plasticity and neurotransmission, and an inducible, high output immune/inflammatory isoform (iNOS) that function as an effector component of the cell mediated immune response. nNOS and eNOS are dependent on Ca^{++} /calmodulin complex for NO production, whereas iNOS is Ca^{++} independent.

NO exerts a wide variety of biologic effects at physiologic concentrations in nearly every organ system. NO is an important mediator of relaxation of smooth muscle of vascular, gastrointestinal, airway and cavernous tissues. In the central nervous system NO is a neurotransmitter that underpins several functions, including the formation of memory. In the periphery it regulates various gastrointestinal, respiratory and genitourinary tract functions. In addition NO has a function host defence and immunologic reactions. Enhanced formation of NO may contribute to circulatory failure, myocardial dysfunction, organ injury and ultimately multiple organ dysfunction syndrome. Enhanced formation of NO, on the other hand, may also exert beneficial effects including vasodilatation, prevention of platelet and leucocyte adhesion, improvement of microcirculatory blood flow and tissue oxygenation.

Key Words: Nitric Oxide, Nitric Oxide synthase, NOS

T Klin J Pediatr 2001, 10:

Tanımlar ve Tarihçe

Nitrik Oksit (NO•) ortam havasında belli bir oranda yeralan atmosferik bir gazdır. NO• sigara dumanı, egzoz gazı ve kirli havada daha yoğun

Geliş Tarihi: 02.06.2000

Yazışma Adresi: Dr. Mehmet TURGUT
Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi
23119, ELAZIĞ

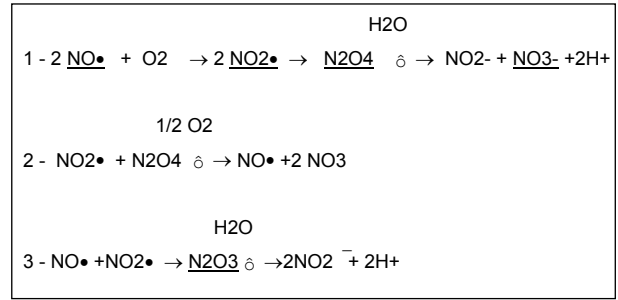
olarak bulunmaktadır. 1980'lerde Furchgott ve Zawadski, organ banyosuna aldıkları izole arter preparatlarında, asetilkolinle oluşturdukları relaksasyonun, kesinlikle endotele bağımlı olduğunu ve bu etkinin "labil bir hormonal faktör" ile sağlandığını göstermişlerdir. Çünkü asetilkolinle oluşan bu gevşeme, arteriyel endotel uzaklaştırıldığında veya harap edildiğinde görülmemiştir (1). Bundan dolayı bu faktör EDRF olarak adlandırılmış, ardından EDRF ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. Başlangıçta EDRF, araşidonik asidin lipooksijenaz kolundaki bir ara ürün olarak değerlendirilmiştir. 1987'ye gelindiğinde ise, İgnarro ve ark (2) ile Palmer ve ark (3) ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda, EDRF'yi damar endotelinden izole etmişler ve bu yapının dominant kısmının NO• olduğunu tesbit etmişlerdir. 1988 de Palmer ve arkadaşlarının EDRF ile ilgili yaptıkları araştırmada, bu molekülün yarı ömrünün çok kısa olduğu, aktivitesinin saniyeler içinde oluşup, bir başka forma dönüşerek sona erdiği görülmüş ve mevcut yapının NO• olduğuna dair veriler iyice pekişmiştir. Yine aynı araştırmalar sırasında, NO•'nun L-argininden sentezlendiği keşfedilmiş ve NO• sentezi reaksiyonunu gerçekleştiren enzime ise NOS adı verilmiştir (4,5).

Araştırmalar arttıkça NO•'nun fizyolojik ve patolojik olaylardaki rollerinin boyutları genişlemiş ve Amerika'da 1992 yılı'nın Aralık ayında, 'Scien-ce' dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir.

Nitrik Oksitin Yapısı ve Özellikleri

Bilindiği gibi, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom ya da moleküllere 'radikal' denir ve yapının üzerine konan bir nokta (•) işareti ile gösterilir.

Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO• serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. NO• lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir (4,5). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO• bilinen en düşük molekül ağırlıklı, reaktif (biyoaktif) memeli hücreleri sekresyon ürünüdür (6). Düşük konsantrasyonlarda iken NO• toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol alır.

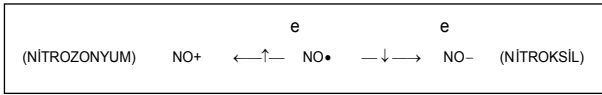


Şekil 1. Nitrojen oksitler (NOx)'in sentez reaksiyonları.

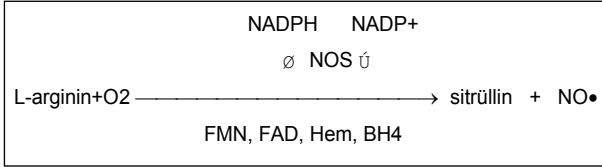
Tablo 1. Nitrojen oksitler (NOx)

Sembol	İsim	Etki
NO•	Nitrik oksit	Serbest radikal.
NO ₂ •	Nitrojen dioksit	S. radikal, Nitroze edici ajan.
N ₂ O	Nitroz oksit	Anestezik.
N ₂ O ₃	Dinitrojen trioksit	Nitroze edici ajan.
N ₂ O ₄	Dinitrojen tetraoksit	Dimerik NO ₂ •, nitroze edici ajan.
NO ₂ ⁻	Nitrit	Asidik ortamda NO• oluşturur.
NO ₃ ⁻	Nitrat	Stabil anyon.

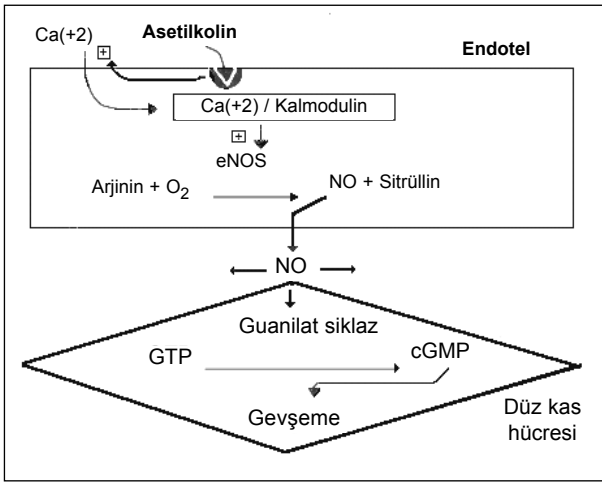
NO• (:N: :O:); Azot monoksit veya nitrik oksit olarak adlandırılır. Atmosferdeki bakteriler, asit yağmurları, jetler, baca gazları, egzoz gazları ile tüten sigaralar NO• ve diğer reaktif oksijen türlerini üreterek hava kirliliğine neden olabilirler. Havadaki NO• oksijenle oksitlenerek çok kısa sürede NO₂⁻ (nitrit) ve NO₃⁻ (nitrat) oluşturur, NO•'in açık formülünde görülen çiftlenmemiş elektronu, azot ve oksijen atomları üzerinde yer değiştirerek 'rezonans stabilitesi' sağlar, reseptörden bağımsız olarak membranlardan kolayca difüze olabilir (7,8). Tüm bu özellikleri NO•'e ideal bir haberci molekül özelliği kazandırmaktadır (7). Ayrıca su ve oksijen varlığında, 3-20 saniye gibi çok kısa bir yarı ömre sahiptir, kolayca oksitlenir. Böyle bir ortamda NO• aşağıda gösterildiği gibi bir dizi nitrojen oksitlerine (NOx) dönüşebilir(8,9). Şekil 1'de NO• ve bunun okside metabolitleri (nitrojen oksit)'nin sentez yolları, Tablo 1'de ise NO• ve bunun okside metabolitleri (nitrojen oksit)'nin başlıcaları görülmektedir. NO• ve tekrar NO•'ya dönüşebilen nitrojen oksitleri (NO₂•, N₂O₃, N₂O₄ vb), güçlü nitroze edici ajan-



Şekil 2. Nitroksil (NO-) sentezi.



Şekil 3. NO sentezi.



Şekil 4. Damar duvarında NO'nun oluşumu ve etki mekanizması.

lardır ve primer ile sekonder aminleri nitrozleyerek, nitrozaminleri oluştururlar.

$R_2-NH + NO_x \rightarrow R_2N-N=O \rightarrow$ Nitrozamini simgeler ve potansiyel bir karsinojeniktir. Çünkü bu bileşikler DNA'da, nitrozilasyon, deaminasyon yapabilir ve alkil nükleofil'lerin oluşumuna neden olabilirler. Bu şekilde oluşan mutasyonlar onkogenleri aktifleyerek malign transformasyonlara neden olabilir.

NO• bir elektron kaybederek nitrozoniyum katyonuna (NO⁺), bir elektron alarak nitroksil aniyonuna (NO⁻) dönüşebilir (Şekil 2) (6,9).

Düşük konsantrasyondaki NO•'nun hemoglobine bağlanma affinitesi oksijene nazaran oldukça yüksektir. Hemoglobin oksijen formunda ise NO•'i önce NO₂(nitrit)'e ardından NO₃(nitrat)'a oksitler.

Görüldüğü gibi dolaşımdaki oksihemoglobin NO• için kuvvetli bir oksidan olup onun etkilerini engelleyen bir inhibitördür (8,10).

Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Yapısı ve Özellikleri

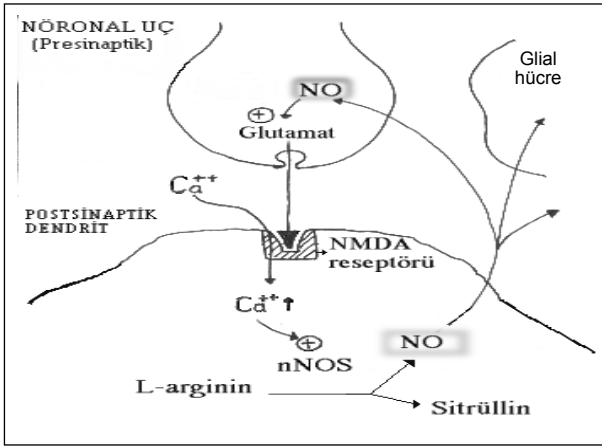
Nitrik Oksit vertebralılarda, sitokrom P-450 redüktazın homoloğu olan NOS yardımıyla L-argininden sentezlenir. NOS; sit.P-450 gibi Fe içeren protoporfirin IX'a sahiptir (8,11). NO sentezlenirken (L-argininden \rightarrow sitrüllin+NO•) NOS dışında moleküler oksijen ve dört tane kofaktöre ihtiyaç duyar ve bunlar Hem, FAD(flavin adenin dinukleotid), FMN (flavin mono nukleotid) ile BH₄ (tetrahidrobiopterin)'dir (Şekil 3) (11,12). Yine sit.P-450'de olduğu gibi, moleküler oksijen protoporfirine bağlanmadan önce, Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye redüksiyonu gerekmektedir. Son görüşlere göre; NOS uyarıldığında, iki oksijen molekülünün aktivasyonu ile bir çift oksijen atomu, L-arginine girerek NO• ve sitrüllin üretilmektedir (8,11,12).

Nitrik Oksit Sentazın Uyarılması

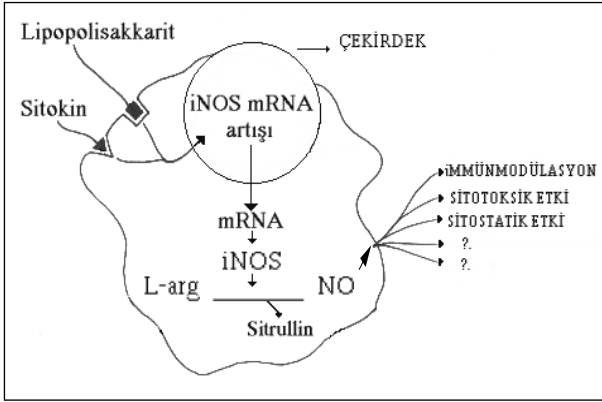
Bu enzim iki şekilde uyarılmaktadır.

1. Yapısal tipe özgü olarak: Asetilkolin gibi bir haberci, endotel hücresi üzerindeki reseptörüne yapışır ve bu impulsla Ca⁺⁺ iyon kanalları açılarak, hücre içi Ca⁺⁺ düzeyi yükselir. Ardından Ca²⁺'un kalmoduleline bağlanmasıyla oluşan kompleks, yapısal bir enzim olan eNOS'ı uyarır ve L-arginin'den NO• ile sitrüllin oluşur. Oluşan NO•, endotelden çıkarak komşu düz kas hücrelerine girer. Düz kas hücrelerinin sitozolindeki guanilat siklaz hem gurubundaki demire bağlanır, onu aktive eder ve GTP'den cGMP oluşumunun artmasına neden olur. Artan cGMP ise düz kasların gevşemesine ve damarlarda vazodilatasyona neden olur (Şekil 4). Ayrıca diğer bir yapısal enzim olan nNOS da aynı mekanizma ile uyarılmaktadır (Şekil 5) (12-14).

2. Uyarılabilir tipe özgü olarak: Burada lipopolisakkaritler ve sitokinler gibi ajanların Ca²⁺'ye bağımlı olmadan NOS'ı indüklemeleri söz konusudur. İlgili hücrede önceden NOS yoktur veya çok azdır. Uyarıcılar tarafından transkripsiyonel olarak (mRNA artışıyla) enzim indüklenir



Şekil 5. nNOS'un NMDA ile ilişkisi ve sinir sistemindeki etkileri.



Şekil 6. iNOS'un makrofajlardaki induksiyonu ve ürettiği NO'nun etkileri.

ve sonuçta oluşan NO• amaca uygun işlevini gerçekleştirir. Bu sistem özellikle makrofajlarda görülür, bu tip enzim induklenebilir NOS olarak adlandırılır (Şekil 6) (11-13).

Nitrik Oksit Sentaz İzoenzimleri

Bunlar temel olarak iki ana grupta incelenir.

A) Yapısal (Constitutive) NOS : cNOS.

Bu izoformun ayırıcı özelliği aktivitesinin Ca^{++} 'a (ikincil haberci olarak) bağımlı olmasıdır. Özellikle damar endotel hücreleri (13,14), ürogenital sistem dokuları (15-17), santral ve periferik sinir sistemi nöronları (18-22), adrenal korteks ve medulla hücreleri (23), trombositler (24-26), uterus ve barsak interstiyumunda bulunmaktadır (27,28). Hücre içi iyonize kalsiyumu artıran her türlü etki-

leşimde, kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks ya Ca^{++} ya da kalmodulin cNOS'un aktifleşmesini sağlar ve NO sentezlenir (Şekil 4). Ancak kalsiyumu arttıran uyarı kesilince, hücre içi Ca^{++} 'da azalmaya başlar ve enzim aktivitesi ortadan kalkarak NO• sentezi durur. Bu yüzden bu izoform, normal biyolojik sistemlerde düşük miktardaki NO• sentezinden sorumludur. Sonuç olarak cNOS ilgili hücrelerde daima mevcuttur fakat Ca^{++} düzeyi yükselinceye kadar inaktif durumdadır (11-14).

Yapısal NOS'un nNOS ve eNOS olarak adlandırılan iki izoformu mevcuttur. Rat ve domuz serebellumundan saflaştırılan nNOS dimerik yapıda, molekül ağırlığı; 150000-160000 dalton arasında ve bir sitozolik protein olduğu (13,14), sığır endotelinden saflaştırılan eNOS'un ise membrana bağlı, 130000 dalton ağırlığında ve yine dimerik yapıda olduğu rapor edilmiştir (12,14). Ancak eNOS'un aminoterminalinde nNOS'tan farklı olarak 'myristic asit' bulunur.

cNOS izoenzimlerinin başlıca buldukları yerler ve etkileri farklıdır (11-46).

I. nNOS kaynaklı NO: Esas olarak sinir sisteminde bulunmakla beraber başka dokularda da tespit edilmiştir.

a) Merkezi sinir sistemi;

- Santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. Bilinen en düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir. Presinaptik uçtan salgılanan glutamat'ın etkisiyle (glutamat NMDA reseptörlerine bağlanır), postsinaptik uçtaki hücrenin NOS'u aktifleştirilir ve oluşan NO ile hedeflenen etkisini oluşturur (18-21).

- Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur (19).

- Koku alma (19), görme (29), ağrıyı algılama (21,22), ve hafıza oluşması (19) gibi işlevlerde rol oynar.

b) Periferik sinir sistemi;

- Nonadrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak rol oynar (19-22).

- Solunum fonksiyonlarında (30), penil erektsiyonda (31), GİS (gastrointestinal sistem) motilitesinde (28), mesane sfinkter işlevinde (15), ve tüm dokuların kan basınçlarının ve akış

Tablo 2. cNOS ile iNOS arasındaki farklılıklar

Özellik	cNOS	iNOS
Ca ⁺⁺ a bağımlılık	Var	Yok
NO oluşum düzeyi	pmol	Nmol
Uyarana yanıt	Ani	Geç
NO üretim süresi	Kısa	Uzun
Glukokortikoidlerin etkisi	Etkilenmez	Uyarılması inhibe olur.

hızının düzenlenmesinde rol alır.

II. eNOS kaynaklı NO:

- Düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını ve dolayısıyla kalp kasılmasını regüle eder (32,33).
- Trombositlerin, adezyon ve agregasyonlarını inhibe eder (24-26).
- Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahiptir (35).

B) Uyarılabilir (inductible) NOS : iNOS.

İlk olarak endotoksin ve sitokinler tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. Mürin makrofajlarına ve rat nötrofillerine, gama interferon ve lipopolisakkarit uygulanarak yapılan çalışmalarda, iNOS'un da cNOS gibi dimerik yapıda ve sitozolik bir protein olduğu, molekül ağırlığının ise 130000 dalton civarında olduğu bildirilmiştir (11-13). Bu izoform aktivite için Ca⁺⁺a bağımlı değildir (Şekil 6). Bunun nedeni enzimin kalmodulinle çok sıkı bağlanmış olması olabilir. Fakat kalmodulinin buradaki rolü bilinmemektedir. iNOS başta makrofajlar (monosit, histiyosit, kupfer hücreleri vs.) olmak üzere PMNL (polimorfonükleer lökosit)'ler (36,37), hepatositler (38), damar düz kasları (11,12), damar endoteli (12), astrosit (20) ve kondrositler (39) tarafından üretilebilir. Enzim indüklendiği zaman NO• üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Özellikle non spesifik immünitede önemli rol oynar. Bakteri(40), mantar, virüs (41) ve tümör hücreleri (42) ile protozoonlara (43) sitotoksik veya sitostatik etki oluşturur. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıklar(transplantın reddi, artritis, multipl sklerozis, astma vb.) da rol oynadığı bildirilmiştir (44-46). iNOS hücrenin genel yapısında mevcut

değildir. Ancak hücrenin bakteriyel ürünler ve sitokinler ile temasını takiben, birçok hücre tipinde üretimi uyarılır. Bu uyarılma transkripsiyonel induksiyon (enzimi sentezleyen mRNA'nın artışı) yoluyla olmaktadır (11-14,47).

cNOS'un bilinen iki formunun (eNOS ve nNOS) aktivasyonu ise Ca⁺⁺-kalmodulin kompleksine bağımlıdır. cNOS ile iNOS'un özellikleri arasındaki bazı önemli farklılıklar Tablo 2'de özetlenmiştir.

Nitrik Oksitin Etki Mekanizması

Hücrelerarası iletimi sağlayan moleküller (hormonlar, nörotransmitterler, büyüme faktörleri vb.) bu etkilerini daha çok plazma membranındaki spesifik proteinlere bağlanıp, hücre içi cAMP miktarını artırarak gerçekleştirirler. Buna karşın NO• üretildiği hücreden dışarı çıkarak direkt hedef hücrelerine yönelir. Sonuçta hedef molekülüne bağlanarak direkt olarak veya enzim aktivitesini değiştirerek amaçlanan etkiyi oluşturur. Buna eNOS'ın vazodilatasyon, nNOS'un sinaptik transmisyon ve makrofaj iNOS'unun savunmayla ilgili etkileri örnek olarak verilebilir (Şekil 4-6).

NO•'in karakterize edilmiş en önemli hedef molekülleri; demir, kükürt ve oksijen türevi yapılarıdır (10,13,14). Makrofajlardaki NO•, tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak antimikrobiyal ve antitümöral sitotoksik etki gösterir. Aynı mekanizmayla MET (mitokondriyal elektron transport sistemi) zinciri enzimlerinin aktivitesini de azaltır (8,38). Ayrıca NO•, tümör hücresindeki ribonükleotid redüktaz'ı inhibe ederek DNA sentezini engeller (42,48). NO• ferritinle reaksiyona girerek serbest demir salınımına yol açabilir ve bu serbest demir ise lipid pe-roksidasyonunu başlatabilir (49).

NO•'nun bir diğer hedefi sülfhidril (-S-H) grubudur. S-H ile reaksiyona girerek S- nitrozilasyon yapabilir ve plazminojen aktivatörü gibi bazı enzimlerin katalitik fonksiyonlarını artırabilir. NO•'in önemli bir hedefi de bir oksijen radikali olan süperoksit (O₂•-) molekülüdür (50). Bu ikisinin (NO• ve O₂•-) tepkimesiyle oluşan peroksinitrit (ONOO-)'den, nitrojen dioksit (NO₂-) ile hidroksil (OH•) radikali oluşabilir. Yine NO•'in

lipidler üzerine olan etkisiyle lipid peroksidasyonu başlatılır ve çeşitli peroksitler üretilebilir (8,9).

Hastalıkların Fizyopatolojisi İle Nitrik Oksitin İlişkisi

Yapılan araştırmalara göre NO• ile birçok hastalık arasında sıkı bir ilişki vardır.

A. Kardiyovasküler sistem (KVS) hastalıkları

NO•'in en iyi incelenmiş etkileri KVS ile ilgilidir. Bunlar;

Koroner arter spazmı: Spazm, koroner arterlerde ya spontan olarak (prinzmetal anjina), ya da aterosklerotik koroner arter hastalığı (KAH)'nın seyriinde ortaya çıkabilir. Koroner spazmı, stabil KAH'ı olan hastaların anjina eşliğini de düşürebilir. Bu klinik tablolar da NO• yetmezliğinin önemli katkısının olması kuvvetle muhtemeldir. Nitekim yapılan çok sayıdaki araştırmada, eNOS'un özel inhibitörlerle inhibisyonu sonucu lokal ve sistemik vazokonstriksiyon ve hipertansiyonla kombine tablolar ortaya çıkmaktadır (32-34). İlave olarak, dışardan verilen nitro bileşikler (trinitrogliserin, Na-nitropurussid, izosorbid dinirat ve daha yeni olan malsidomin)'nin vazodilatasyon yaptığı yıllardır bilinmektedir. Bu ilaçlar etkilerini NO• oluşturarak gösterirler ve bu nedenle anjina pektoris, hipertansiyon gibi hastalıklarda tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (32,51).

Ateroskleroz: Ateroskleroz'u olan insan ve deney hayvanlarında endotele bağımlı gevşeme belirgin biçimde azalmaktadır (32,33,51). Endotel bütünlüğünün bozulduğu plak ve yırtık alanlarındaki gevşemenin azalması beklenen bir sonuç olabilir fakat aterosklerozlu hastaların normal damar kısımlarında da bu azalma görülmektedir. Araştırmacı-lara göre bunun nedeni endotel disfonksiyonudur ve bu duruma; NO•'in süperoksit radikalleri tarafından yıkımının artması, hücrelerin reseptör fonksiyonlarının bozulması ve endotel hücrelerinin NO• prokürsörü olan L-arginin'i alma veya meta-bolize etme fonksiyonlarındaki bir aksaklık yol açabilir. Endotelial disfonksiyon, hiperlipidemi patogeneziyle benzerlik göstermektedir. Deneysel olarak hiperkolesterolemi oluşturulan hastalarda da endotel hücrelerinin süperoksit üretimi artmıştır (33).

Mikrosirkülasyon: Deneysel araştırmalar NO•'in mikrosirkülasyondaki vazodilatasyona katkısı olduğunu göstermektedir. Mikrosirkülasyondaki endotelyuma bağlı vazodilatasyon mekanizması, diyabet, hipertansiyon, ve özellikle de hiperlipidemik hastalarda bozulmuştur (33,34). Bu durum NO•'in genel dolaşım yanında, doku ve organların lokal sirkülasyonlarında da etkili olduğunu göstermektedir.

KVS'deki diğer etkileri: Koroner arterler egzersiz sırasında artan O₂ ihtiyacını karşılamak için, dilate olma yeteneğindedirler. Bu vazodilatasyon yeteneği endotele bağımlı olup, NO•'in aracılık ettiği bir olaydır. 'Shear stress' tipindeki etkileşimler, endoteldeki Ca⁺² iyon kanallarının açılmasını sağlar, hücre içi Ca⁺² seviyesini artırır. Oluşan Ca⁺²/kalmodulin kompleksi aracılığıyla NOS uyarılarak NO• sentezlenir ve artan koroner kanlanma ihtiyacı önemli ölçüde giderilmiş olur (32,33). Oksijen eksikliği, bir sinyal olarak anjinal ağrıya neden olmakla beraber, direkt olarak koroner arterlerde NO• salgılanmasını da indükler (32). NO•'in trombosit adhezyon ve agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu yönüyle de NO• koroner arter hastalığı için koruyucu bir etkiye sahip olabilir (24-26).

Üretilen NO•'in hücreden çıkış yönünün, ağırlıklı olarak damar duvarındaki düz kaslara doğru olduğu ve daha az oranda lumene doğru salgılandığı kabul edilmektedir (8,13,20). Lümeneye geçen NO•, plazmada çözülmüş O₂ ve O₂•- anyon-ları tarafından hızla (3-30 sn içerisinde) inaktive olmaktadır. Fakat inaktive olmayan NO• ise trombositler ve eritrositlere yönelmektedir(24). Eritrositlere giren NO• oksihemoglobin tarafından inaktive edilir. Yapılan araştırmalar; NO•'in Hb'e olan affinitesinin O₂'e olan affinitesinden daha fazla olduğunu göstermektedir (13). Oksi-Hb, içerdiği hem gurubu ile NO•'i bağlayarak kısa sürede oksitler ve NO₃'e dönüştürüp etkisini engeller (13). Tüm bu mekanizmalar, NO•'in, niçin salgılandığı alandan uzaktaki bölgelerde yeterince etkili olmadığını açıklamaktadır. Yani endotel disfonksiyonuna bağlı olarak NO• üretiminin bozulması halinde sağlıklı endotelin salgıladığı NO• tarafından bu yetersizlik kompanse edilemeyebilir.

B. Hipertansiyon ve böbrek hastalıkları

Hipertansiyonun belli bazı formları (feokromasitoma olduğu gibi) vazokonstriktör maddelerin fazlalığından kaynaklanmaktadır. Eldeki veriler

NO• eksikliğine bağlı hipertansiyonun, NO•'in boşalması sonucunda ortaya çıktığını düşündürmektedir (34,35). Bununla beraber hipertansiyon ya da NO• yetmezliğinden hangisinin önce geldiği henüz kesinleştirilememiştir. NO• inhibitörleri kullanılarak yapılan hayvan çalışmalarında da görüldüğü gibi, NO• yetmezliğinin akut hipertansif krizleri tetikleyebildiği gösterilmiştir (52). Kronik hipertansiyonlu hastaların büyük kısmında NO• düzeylerinin azaldığı bildirilmektedir (14,15,32). Araştırmalar; hipertansiyonlu hastalara, L-arginin veya NO• donörleri verilerek kan basınçlarının düştüğünü, NOS inhibitörleri verilerek yükseldiğini göstermektedir (12,13,52).

Bachmann S, Mundel P ve diğer birçok araştırmacının, üriner sistemde yaptıkları kapsamlı araştırmalar sonucunda elde edilen bütün veriler rapor edilmiştir (15-17,53). Bunlar;

Bradikinin ve asetilkolin NOS sentezini artırarak renal vazodilatasyonu uyarmaktadır. Bazal NO• sentezi bloke edilirse, renal kan akımı ve sodyum atılımı azalır. Bu etkiler kısmen NO• ile 'renin anjiyotensin' sisteminin etkileşimi sonucu oluştuğu sanılmaktadır. Makula densa'dan salınan NO•, afferent arteriyollerde bir daralma olduğunda, tübüloglomerüler reabsorpsiyonu düzenleyebilir (22). Proksimal tübüllerde üretilen NO• ise distal tübüllerdeki aldosteron ile etkileşmektedir (16). Toplama kanallarında solüt transportu için, NO•'e bağımlı bir inhibisyon mekanizması olabilir (15). Glomerüllerde; L-arginin → NO• yolu aktiftir. Glomerulonefrit gibi durumlarda, esas olarak bu bölgeye infiltre olan makrofajlar tarafından, NOS indüklenerek NO• artırılır ve koruyucu etki oluşturulmaya çalışılır. Böbrekten 3 tip NOS izole edilmiştir. Bunlardan;

ENOS izoformu; renal arteriyoller endotelde (15), nNOS izoformu; makula densada (53) ve iNOS izoformu ise afferent arteriyollerin preglomeruler kısmından salınmaktadır (16).

NO•, anjiyotensin II' nin fizyolojik bir antagonisti olarak bilinmektedir. Bundan dolayı NO•'nun, natriürezis'i modifiye ederek tuza duyarlı hipertansiyonda faydalı olabileceği öne sürülmüştür (16,54). Ayrıca NO•'nun renin ekskresyonunu da etkilediğini bildirilmektedir (55).

Bir görüşe göre vücudun doğal NOS inhibitörlerinden olan NN-dimetil arginin'in klirensi kronik

böbrek yetmezliği'nde azaldığı için dolaşımdaki konsantrasyonu artar ve sonuçta NO• üretimi azalır. Bu durum ise renal kaynaklı hipertansiyon oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca esansiyel hipertansiyon'un asıl nedeninin NO• eksikliği olduğunu öne süren hipotezler olmakla birlikte bu konu henüz yeterince aydınlanmış değildir (15,53).

C. Reperfüzyon hasarı

Özellikle koroner damarlarda herhangi bir nedenle iskemi oluştuktan sonra, dokuya gerekli kan akımı yeniden sağlandığında, bir çelişki (oksijen paradoksu) ortaya çıkar. Bir iyileşme beklentisine karşın; kalp kontraktilesinde azalma, fonksiyon kaybı ve tutulan dokuda nekroz gibi olaylar gelişir. Bu reperfüzyon hasarına radikallerin (NO•'da bir radikaldir), özellikle de oksijen radikallerinin sebep olduğu düşünülmektedir (35,55). Bazı araştırmacılar, bu durumda reperfüzyon hasarının şiddetini azaltmak için, NO• donörleri veya nitratların kullanımının, radikalleri süpürücü etkileri dolayısıyla yararlı olduğunu bildirmişlerdir (15).

D. Nitrik oksit ve diyabet

Diyabet'in kronik komplikasyonlarından olan vasküler lezyonların (mikro ve makroanjyopati) gelişmesinden, en azından kısmen de olsa NO• yetersizliğinin sorumlu olduğu söylenebilir (45,56,57). Mikroanjyopatide azalmış NO• konsantrasyonlarına bağlı olarak arter genişlemesinin azaldığı birçok araştırmayla gösterilmiştir. Önceleri fonksiyonu bozulan endotel'in, tek başına azalan NO•'dan sorumlu olduğu düşünülmekteydi. Son araştırmalarda azalan NO•'e ilave olarak, diyabetik hastalarda artan süperoksit radikallerinin, NO•'nun büyük kısmını bloke ettiği (NO•'yu → ONOO•'e dönüştürerek) tesbit edilmiştir (56). Bazı araştırmacılar Tip I diyabetin etyolojisinde NO•'nun yer alabileceğine dair bir mekanizma ileri sürmüşlerdir (57). Buna göre otoimmün bir nedenle aktive olmuş makrofajlar, büyük miktarlarda NO• salgılatarak pankreas'ın adacık hücrelerini hasara uğratmaktadırlar. Yüksek konsantrasyonlardaki NO• sitotoksik etkiye sahiptir. Bu özelliği hayvanlardaki deneysel diyabet modelleri üzerinde incelenmiş ve NOS inhibitörleri uygulanarak pankreasdaki hasarlanmanın azaltıldığı rapor edilmiştir (45,56).

E. Nitrik oksit ve trombosit fonksiyonları

Endotel kaynaklı NO• trombositlere girebildiği gibi, trombositlerde de cNOS enzimi (NO• tarafından uyarılabilen) ve guanilat siklaz bulunmuştur (24). cGMP'nin trombosit içindeki konsantrasyonu arttıkça, trombositlerin adezyon ve agregasyon özellikleri azalır. Bu durum, kollajen, trombin, ADP ve araşidonik asit aracılığıyla tetiklenen trombosit agregasyonunu dengelemeye yarayabilir (25,26). Yine bu mekanizma, aterosklerozun fizyolojik engelleyicileri arasında önemli bir rol alabilir. Herhangi bir nedenle koroner arter endotelinde mekanik bir hasar olursa, endotel disfonksiyonu nedeniyle, lokal NO• yetmezliği sonucu bu bölgelerde kısa sürede, trombosit trombüsleri oluşabilir (14).

Hipertansif hastaların endotel disfonksiyonu ve buna eşlik edebilen NO• yetmezliği, serebral damarlardaki trombosit agregasyon riskini artırır. Bu durum inmeyi (stroke) tetikleyebilir (8). İnme'den korunmak için, nitro bileşiklerinin kullanılması halen araştırılmaktadır.

F. Gastrointestinal sistemde nitrik oksit

Mide mukozasının irritasyonlara cevabı ilgili kısmın kanlanması artış ve mukozal bir bariyerin oluşması şeklindedir. Bu koruyucu mekanizmada NO•'nun etkisinin de bulunması kaçınılmazdır. NO•'nun mukoza ülserlerini korumada, prostoglandin deriveleri gibi koruyucu faktörlerle birlikte sorumlu olduğu düşünülmektedir (28).

NO•, GİS'in nöronal kontrolünde de devreye girmektedir. Bir süredir, GİS duvarında yer alan 'Auerbach' pleksusunda bilginin yayılması için, bilinen nörotransmitterlere ilaveten bir başka ajanın da olması gerektiği düşünülmekteydi. Ancak son araştırmalar nonadrenerjik nonkolinerjik sisteme dahil olan bu bölgelerde de, NO•'in nörotransmitter olarak rol aldığı bildirilmiştir (28,58).

Üst GİS sfinkterindeki patolojilerden 'kalazya'da NO fazlalığından; 'akalazya'da ise eksikliğinden kuşulanılmakta ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. Hatta bu patolojilerin organik nit-ratlar veya NOS inhibitörleriyle başarılı biçimde tedavi edildiğine dair bilgiler de vardır (14,58). Bilindiği gibi barsak peristaltizmi, medulla spina-listen bağımsız ve otonom olarak

kontrol edilmektedir. Konstipasyon ve diyarede de NO•'nun rolü olduğu sanılmakta ve bunu destekleyen bulgular olmakla beraber bu konu hala ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (14).

G. Solunum sistemi hastalıkları

İnsanlar ve bir çok canlının, solunum havasıyla NO• çıkardıklarının belirlenmesinden sonra, bu sistemde NO•'in araştırılması hız kazanmıştır. NO•, deneysel şartlarda bronkospazmı yenmektedir. Deney hayvanlarına inhalasyon yoluyla veril-diğinde, 30 sn içinde bronkodilatasyon görüldüğü bildirilmiştir (59). ARDS (adult solunum sıkıntısı sendromu) olan hastaları tedavi etmek için, NO• gazı kullanılarak yapılan araştırmaların sonuçları ümit vericidir (30). Fakat unutulmamalıdır ki NO• gazı kullanıldığında az da olsa daima daha yüksek moleküllü nitrojen oksitleri ve methemoglobin oluşma riski vardır. Bu nedenle tedavi amaçlı NO• uygulamasında direkt NO• yerine, NO• donörleri aracılığıyla da yapılabilir. Araştırmacılar NO• donörleri olan SNAP (S-Nitroso-N-Asetil-Penisilamin) ve SIN-1(Malsidomin'in metaboliti olan bir peroksinitrit donörü) uygulayarak durumu incelemişlerdir. Sonuçta SNAP'ın yarı ömrü'nün daha uzun olduğu, en az direkt NO• uygulaması kadar etkili olduğu ve yan etkilerinin de daha az olduğu bildirilmiştir (51). Aynı çalışmada SIN-1'inde, NO•'nun direkt uygulanmasına karşı üstünlüklerinin olduğu rapor edilmiştir (51).

H. Sinir sistemi

NO'in santral sinir sisteminde önemli bir transmitteri olan glutamat ile çok sıkı ilişkisi vardır. Nöronlardaki presinaptik terminallerden salgılanan glutamat, post sinaptik membrandaki reseptörüne (NMDA = N-Metil D-Aspartat) bağlandığında, membranın Ca⁺² iyon kanalları açılarak hücre içi Ca⁺² düzeyi artar. Ardından Ca⁺²'a bağımlı nNOS uyarılarak NO• üretilir. Bu NO• özellikle presinaptik bölge olmak üzere her yöne doğru kendine uyan transmisyonu gerçekleştirir. Bu transmisyon akson, dendrit ve glial hücreler üzerine olabilir. Özet olarak, glutamat tarafından başlatılan sinirsel ileti işlevi, olaya NO•'in eklenmesiyle devam etmektedir (Şekil 5) (38,39).

Glutamat beyin gelişiminde çok önemlidir. Bellek ve öğrenme fonksiyonları için esansiyel olduğu bilinmektedir. NO•'nun glutamatla bu sıkı

ilişkisi nedeniyle, hafıza oluşması ve öğrenme fiz-yolojisinde de rolü olduğuna inanılmaktadır (39). Fakat burada fazla glutamat salınımının → NO• miktarını artıracığı ve normalin üstündeki NO• miktarlarının da toksik etkilere neden olabileceği unutulmamalıdır. Bu sonuç dikkate alındığında Alzheimer ve parkinson hastalıkları ile epilepsinin patogenezinde NO•'nun bu özelliğinin etkili olabileceği sanılmaktadır (14,20).

I. Ağrı ve koku alma

Bradikinin güçlü bir ağrı indükleyicisidir. Asetilkolin ise düşük dozlarda iken ağrı reseptörlerini hassaslaştırarak, ağrı oluşturup diğer maddelerin etkilerini potansiyelize eder(21). Bu iki haberci molekül, NO• metabolizmasıyla ilgili olduğuna göre, NO•'nun ağrı oluşması sisteminde yer alması beklenir. Bununla birlikte NO• bazı durumlarda (örn: Bradikinin enjeksiyonundan sonra) periferik ağrıyı şiddetlendirirken, bazı durumlarda (prostoglandinlerin indüklediği hiperaljezide) ise bloke etmektedir(20). Migren ve diğer vasküler tip baş ağrılarından, NO•'in sorumlu olduğuna dair yayınlar mevcuttur (22).

Ancak NO•'in ağrı ile ilişkisi, henüz net olarak aydınlanmış değildir. Ayrıca NO•'nun koku almada da rol aldığı ileri sürülmektedir (20).

İMMÜN SİSTEM: İmmün stimullara ve iltihabi mediyatörlere karşı makrofajlar NO• salgılayarak cevap verirler. iNOS'un ürettiği NO•'in majör fonksiyonu, mikroorganizmalar veya tümör hücrelerine sitotoksik ve sitostatik etki oluşturmaktır. NO•, sitotoksikiteyi iki şekilde gösterir. Birincisi mitokondriyal solunumu bozmak, ikinci görevi ise DNA sentezini direkt bozucu etkisidir (38,42).

Transplante edilen organların reddi reaksiyonlarında rol oynayan makrofajların NO• salgılayarak katıldıklarına dair bulgular vardır. Bunun göstergesi ise red reaksiyonları sırasında aşırı derecede artmış NO• ürünlerinin tesbit edilmesidir (44-46).

Nitrik Oksitin Diğer Fizyolojik ve Patolojik Etkileri

a. NO• korpus kavernozum'un kanlanması sağlayarak penis ereksiyonunu oluşturabilmektedir. Benzer şekilde oluşturulmuş korpus kavernozum dilatasyonu ve penis ereksiyonu NOS in-

hibitörleri tarafından engellenebilmiştir (31). Hatta spontan veya ilaçlara bağlı priapismusta da, NOS inhibitörleri'nin başarıyla denendiği bildirilmektedir.

b. Hayvan deneylerinde, NOS inhibitörlerinin kortizon ve/veya testosteron düzeylerini artırdığına ilişkin bulgular olmakla birlikte karşıt görüşler de mevcuttur (8,60).

c. NO•'nun, uterus kontraktilesinde önemli rolü olduğuna dair bulgular rapor edilmiştir. Son zamanlarda preeklamsi ve eklamsi'nin patogenezinde de NO'in rolü olabileceği düşünülmüş ve araştırmalar devam etmektedir (27,61,62). Bu konuda ki çalışmalar arttıkça, NO•'nun obstetrik ve jinekolojide kullanıma girmesi sürpriz olmayacaktır.

d. NO•'nun alt üriner sistemde ve özellikle işemenin kontrolünde bir nörotransmitter olarak rol aldığına dair güçlü deliller vardır(15).

e. Steroid hormonların modülasyonunun, NO• ve cGMP üzerinden de regüle edildiğine dair, deneysel rat uterusu gözlemleri vardır(8).

f. NO•'nun lökositlerin adhezyonunu engellediğine dair veriler mevcuttur. Septik şokta da NO•, önemli rol oynamaktadır; bu tabloda reaktif oksijen radikallerinin de rolü olduğuna inanılmaktadır(14,62,63).

g. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığının patogenezinde de kısmen de olsa NO•'nun yer aldığına dair bulgular bildirilmiştir (64).

Görüldüğü gibi; NO•, insan organizmasındaki hemen hemen tüm organ ve doku sistemlerinde, çok geniş bir alanda fizyolojik ve patolojik etkilere sahiptir. Özellikle 90'lı yıllardan sonra giderek artan bir ilgiyle karşılaşan NO•'nun bazı sistemlerdeki etkisi henüz tam olarak netleşmiş değildir. Bu yüzden bu konuda yapılan çalışmaların artarak devam edeceği olasıdır.

KAYNAKLAR

1. Furchott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond)*. 1980; 288: 373-6.
2. Ignarro JJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radicals in vasodilatation.

- Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium. (Ed: Vanhoutte PM) Raven Press, New York. 1988: 427-36.
3. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factors. *Nature* 1988; 327: 524-6.
 4. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginin: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem pharmacol* 1989; 38:1709-15.
 5. Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 158: 348-52.
 6. Grisham MB. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997; 169: 70-5.
 7. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann. Intern. Med* 1994; 120: 227-37.
 8. Yallampalli DVM, Smith MB, Sharon MS. Steroid hormones modulate the production of NO and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 1994; 134(4):1971-4.
 9. Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-Nitrosating agents. *Chem Res Toxicol* 1987; 249-57.
 10. Hegesh E, Sniloah J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chim Acta* 1982; 125: 107-15.
 11. Richard K. Nitric oxide synthases. *The Biochemist* . Nov.1994; 16(5): 3-6.
 12. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The J. Biol. Chem.* 1993; 268 (17): 12231-4.
 13. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298: 249-58.
 14. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharm Rev* 1991; 43: 109-41.
 15. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localisation and function. *Am. J Kidn Dis.* 1994; 24 (1): 112-29.
 16. Ohishi K, Carmines P, Inscho EW. EDRF, Angiotensin II, in rat juxtamedullary afferent and efferent arterioles. *Am. J. Physiol.* 1992; 32: F900-6.
 17. Cook T, Sullivan R. Glomerular nitrite synthesis in situ immune complex glomerulonephritis in the rat. *Am. J. Pathol.* 1991; 139: 1047-52.
 18. Hua Wan, Yu Amy. Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. *The J Histochem and cytochem* 1994; 42(4): 451-7.
 19. Katayama Y. Nitric oxide: Mysterious messenger. *Dojindo News Letter* 1995; 1:1-20.
 20. Snyder SH. Nitric oxide and neurons. *Curr. Opin. Neurobiol* 1992; 2: 323-38.
 21. Durate ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of NO-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1991; 206: 163-4.
 22. Olesen J, Thomsen LL, Iversen H. Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trend Pharmacol Sci Engl* 1994; 15(5): 149-53.
 23. Palacios M, Knowles RG, Palmer RJM and Moncada S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 802-9.
 24. Muuruganandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 802-9.
 25. Radomski MW. Endogenous nitric oxide inhibits platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1988; 11: 1057-8.
 26. Salvemini D, Denucci G, Gryglewski RJ. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Pros Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6328-32.
 27. Chwalisz K, Buhimschi I, Garfield RE. Role of NO in obstetric. *Prenat Neonat Med* 1996; 1: 292-328.
 28. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic dysfunction. *Gastroenterology* 1992; 103: 1928-49.
 29. Haeflinger IO, Flammer J, Luscher TF. Nitric oxide and endothelium are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33(7):2340-8.
 30. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328: 399-402.
 31. Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS. Nitric oxide a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401-3.
 32. Bossenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drug Ther (USA)* 1994; 8(4): 601-10.
 33. Drexler H, Zeiher AM, Meinzerk H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic human. *J Clin Invest* 1992; 90: 1248-53.
 34. Kaley G. EDRF in the microcirculation. *Blood Vessels* 1986; 23: 81-90.
 35. Usmar VD, Radomski M. Free radicals in the vasculature: The good, the bad and the ugly. *The Biochemist* 1994; 16(5): 15-22.
 36. Mc Call TB, Feelisch M, Palmer RMJ, Moncada S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of NOS in phagocytic cells. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 234-8.
 37. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB. Activated macrophages destroy intracellular leishmaniasis. *Ann Med (England)*. Jun 1995; 27 (3): 369-77.
 38. Stadler J, Billiar TR, Curran RD. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991; 260:C910-6.
 39. Palmer RMJ, Hickery MS, Charles IG. Induction of NOS in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;

- 193(1): 398-405.
40. Dunlop NE, Benjamin HW and Briles ED. The intracellular nature of salmonella infection. *Macrophage* 1994; 18: 303-12.
41. Croen KD. Evidence for an antiviral effect of NO. *J Clin Invest* 1993; 91: 2446-52.
42. Kwon NS, Stuehr DS, Nathan CF. Inhibition of tumor cells ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 442-8.
43. Liew FY, Li Y, Millott S. TNF-alpha induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* 1990; 71: 556-9.
44. Francis MC, Allen N, Mizel JB, Albina DE. Suppression of arthritis by an inhibitor of NOS. *J Exp Med* 1993; 178: 749-54.
45. Corbett JA, Mc Daniel ML. Nitric oxide mediated autoimmune destruction of beta cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes USA* 1992; 41(8): 899-903.
46. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Barnes P. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133-5.
47. Hikik Y, Yui Y, Hattori R. Three regulation mechanisms of NOS. *Eur J Pharmacol* 1991; 206: 163-4.
48. Stuehr DJ and Nathan CF. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989; 169: 1543-55
49. Lancaster JR, and Hibbs Jb JR. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1223-7.
50. Mc Call TB, Boughton SNK, Palmer RMJ. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 1989; 261: 293-6.
51. Luscher TF, Richard V. Interaction between endothel derivating NO and SIN-1 in human and porcine blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 14: 76-80.
52. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R and Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothel derivated NO synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 746-52.
53. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS. NOS in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11993-7.
54. Appel RG, Wang J, Simonson MS. A mechanism by which atrial natriuretic factor, mediates its glomerular actions. *Am J Physiol* 1989; 251: F1036-42.
55. Jaeschke H, Schini VB, Farhood A. Role of NO in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury. *Life Sci* 1992; 50: 1787-96.
56. Panagiotidis G, Alm P, Lundquist I. Inhibition of islet NO synthase increases arginine-induced insulin release. *Eur J Pharmacol* 1992; 229: 277-81.
57. Elabbady AA, Gagnon C, Hassouna MM. Diabetes mellitus increase NO synthase in penises but not in major of rats. *Br J Urol pelvic ganglia* 1995; 76: 196-202.
58. Pigue JM, Espluques JV, Whittle J. Endogenous NO as a mediator of GIS peristaltism. *Gastroenterology* 1992; 102: 168-74.
59. Dupuy PM, Shore SA, Drazem JM. Bronkodilatore action of inhaled NO in quina-pig. *J Clin Invest* 1992; 90: 428-32.
60. Radomski MW, Palmer RMJ and Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive NOS in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 10043-7.
61. Jenny V, Gutierrez Y, Blanca I. Nitric oxide in different types of hypertension during pregnancy. *Clinical Science* 1997; 93: 413-421.
62. Roggensack AM, Zhang Y, Sandra T. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 1999; 33: 83-9.
63. Hatanaka Y, Fujii J, Fukutomi T. Reactive oxygen species enhances the induction of inducible nitric oxide synthase by sphingomyelinase in RAW264.7 cells. *Biochimica et Biophys Acta* 1998; 1393: 203-10.
64. Moore B, Rowland R. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and crohn disease. *The Lancet* 1993; 8867: 338-40.