

Received: 2003.07.09

Accepted: 2003.08.30

Published: 2004.03.03

Oksygenaza hemowa i tlenek węgla w fizjologii i patologii układu krążenia

Heme oxygenase and carbon monoxide in the physiology and pathology of the cardiovascular system

Jerzy Bełtowski, Anna Jamroz, Ewelina Borkowska

Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie

Oksygenaza hemowa (HO) rozkłada hem do tlenku węgla (CO), jonów żelazawych i biliwerdyny, zredukowanej następnie do bilirubiny przez reduktazę biliwerdynową. HO występuje w trzech izoformach. Ekspresja HO-1 w warunkach fizjologicznych jest niewielka, wzrasta natomiast pod wpływem wielu czynników, takich jak stres oksydacyjny, zapalenie, tlenek azotu, wysokie stężenie substratu i hipoksja. HO-2 jest konstytutywnym enzymem biorącym udział w wytwarzaniu CO w układzie krążenia i nerwowym. HO-3 ma małą aktywność katalityczną. Podobnie jak tlenek azotu, CO aktywuje rozpuszczalną cyklazę guanylową i zwiększa syntezę cGMP w komórkach. Jony Fe^{2+} uwalniane z cząsteczki hemu stymulują wytwarzanie ferrytyny, która podobnie jak barwniki żółciowe, działa antyoksydacyjnie. CO rozszerza naczynia krwionośne za pośrednictwem cGMP, a także przez aktywację kanałów potasowych w komórkach mięśni gładkich. Poza tym CO hamuje agregację płytek krwi, proliferację komórek mięśniówki naczyń i apoptozę oraz stymuluje angiogenezę. Zarówno niedobór jak i nadmiar HO-1 może odgrywać rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Indukcja HO-1 zmniejsza nasilenie miażdżycy i uszkodzenie mięśnia sercowego poddanego niedokrwieniu i reperfuzji. Farmakologiczne i genetyczne indukowanie HO-1 oraz stosowanie egzogenego CO wydają się obiecującymi metodami terapeutycznymi w leczeniu chorób układu krążenia.

Słowa kluczowe:

oksygenaza hemowa • tlenek węgla • biliwerdyna • bilirubina • reduktaza biliwerdynowa • nadciśnienie tętnicze • miażdżycza • uszkodzenie w następstwie niedokrwienia z reperfuzją

Summary

Heme oxygenase (HO) degrades heme to carbon monoxide (CO), ferrous ions, and the bile pigment biliverdin, which is subsequently reduced to the other important bile pigment, bilirubin, by biliverdin reductase. Fe^{2+} liberated from the heme molecule upregulates ferritin production, and bile pigments are potent endogenous antioxidants. The HO enzyme exists in three isophorms: HO-1 is expressed at low levels under physiological conditions, but is induced by numerous factors, including oxidative stress, inflammation, nitric oxide, an elevated level of substrate, and hypoxia. HO-2 is a constitutive enzyme involved in the baseline production of CO in the cardiovascular and nervous systems, whereas HO-3 is also ubiquitously expressed, but possesses low catalytic activity. Like nitric oxide, CO activates soluble guanylate cyclase and elevates cGMP in target tissues, which dilates blood vessels. It also does this by directly activating potassium channels in vascular smooth muscle cells. In addition, CO inhibits platelet aggregation and proliferation of vascular smooth muscle cells, inhibits apoptosis, and stimulates angiogenesis. Both deficiency, and excess of HO-1 may be involved in the pathogenesis of arterial hypertension. Induction of HO-1 attenuates atherosclerosis and myocardial ischemia-reperfusion injury. Pharmacological and genetic induction of HO-1 as well as the delivery of exogenous CO are promising therapeutic strategies for the treatment of cardiovascular diseases.

Key words:

heme oxygenase • carbon monoxide • biliverdin • bilirubin • biliverdin reductase • arterial hypertension • atherosclerosis • ischemia-reperfusion injury

Adres autora:

dr Jerzy Bełtowski, Katedra i Zakład Patofizjologii AM, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin, e-mail: patfiz@asklepios.am.lublin.pl



Full_text PDF:	http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/4833.pdf
Word count:	13033
Tables:	4
Figures:	2
References:	166

Wykaz stosowanych skrótów

BVR – reduktaza biliwerdynowa (biliverdin reductase), **CO** – tlenek węgla (carbon monoxide), **HO** – oksygenaza hemowa (heme oxygenase), **NOS** – syntaza tlenku azotu (nitric oxide synthase), **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostowy (platelet-derived growth factor), **PGE₂** – prostaglandyna E₂ (prostaglandin E₂), **sGC** – rozpuszczalna cyklaza guanylowa (soluble guanylyl cyclase), **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu typu β (transforming growth factor-β), **VEGF** – czynnik wzrostu komórek śródbłonka (vascular endothelial growth factor).

WSTĘP

Tlenek węgla (CO) powstający w wyniku niecałkowitego spalania związków organicznych był przez wiele lat wyłącznie przedmiotem zainteresowania toksykologów jako jedna z najczęstszych przyczyn ostrych zatruc. Chociaż już w 1952 roku wykazano, że CO powstaje w ustroju ssaków, uważano go jedynie za produkt uboczny metabolizmu bez istotnego znaczenia fizjologicznego [28]. Badania ostatnich lat dowodzą, że endogenny tlenek węgla pełni rolę mediatora o wielokierunkowej aktywności biologicznej, a enzym który go wytwarza – oksygenaza hemowa (HO) – ma istotne znaczenie w fizjologii i patologii wielu narządów. Znaczenie CO jako przekaźnika w układzie nerwowym zostało szczegółowo omówione w artykułach przeglądowych, również w piśmiennictwie polskim [10, 44]. W niniejszej pracy przedstawiono najważniejsze informacje na temat roli oksygenazy hemowej i tlenku węgla oraz omówiono ich znaczenie w fizjologii i patologii układu krążenia.

HEM I OKSYGENAZA HEMOWA

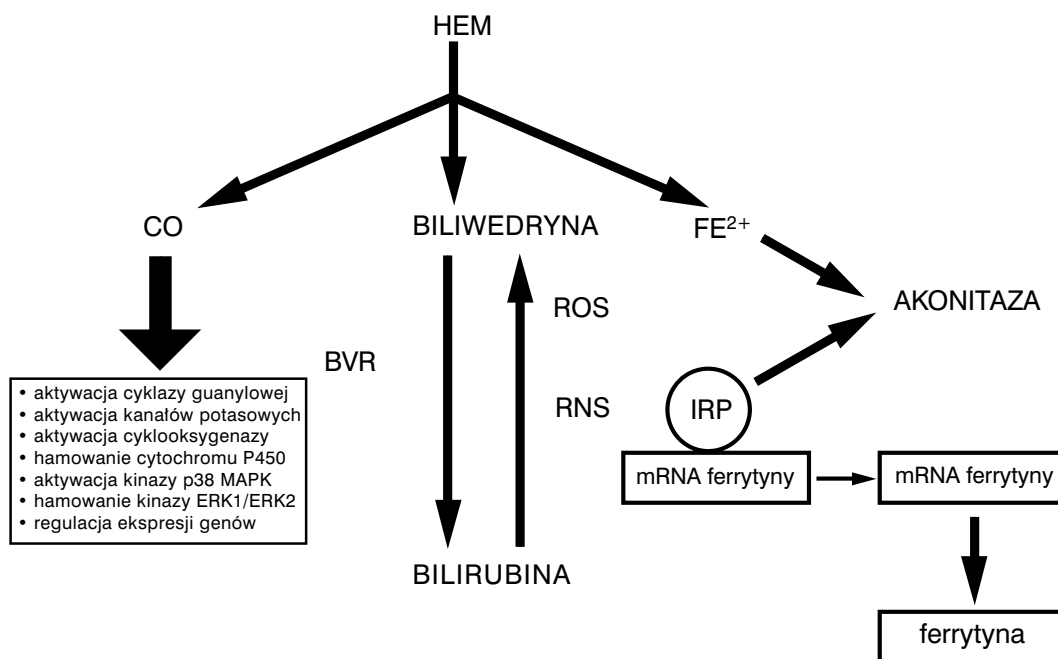
Hem stanowi grupę prostetyczną wielu białek, takich jak hemoglobina, mioglobina, cytochromy, mieloperoksydaza, peroksydaza glutationowa, katalaza, syntaza tlenku azotu, cytoplazmatyczna cyklaza guanylowa i cyklooksygenaza kwasów tłuszczowych. Częsteczką hemu składa się z pierścienia porfirynowego (protoporfiryna IX) i jonu Fe²⁺. Protoporfiryna IX jest złożona z czterech pierścieni pirolowych połączonych wiązaniami metenowymi (-CH=) oznaczonymi jako α, β, γ i δ. W warunkach prawidłowych hem występuje w tkankach wyłącznie w postaci połączeń z białkami. Hem niezwiązany z białkami ma silne własności utleniające i powoduje uszkodzenie komórek w mechanizmie stresu oksydacyjnego [34, 82, 83]. Oksygenaza hemowa (HO, EC 1. 14. 99. 3) znajdująca się we frakcji mikrosomalnej komórek rozkłada hem do biliwerdyny, tlenku węgla i kationu żelazawego (Fe²⁺) (ryc. 1). W reakcji katalizowanej przez HO są wykorzystywane elektrony dostarczane przez NADPH-zależną reduktazę cytochromu P450. W pierwszym etapie dochodzi do utlenienia

hemu do α-metahydroksyhemu, który następnie reaguje z tlenem tworząc werdohem i CO. Werdohem ulega konwersji do biliwerdyny. Porfiryny zawierające “niefizjologiczne” metale, takie jak protoporfiryna cynkowa (ZnPP) lub cynowa (SnPP) są inhibitorami oksygenazy hemowej, ponieważ blokują miejsce wiązania substratu. Związki te są wykorzystywane w badaniach doświadczalnych. Metaloporfiryny nie są swoistymi inhibitorami HO, gdyż zmniejszają one też aktywność syntazy tlenku azotu (NOS) oraz cytoplazmatycznej cyklazy guanylowej (sGC). Jednak hem jest związany z cząsteczkami tych enzymów znacznie ściślej niż z oksygenazą hemową, dlatego hamowanie ich aktywności obserwuje się wyłącznie przy dużych stężeniach inhibitorów. Ciekawe, że ZnPP występuje w ustroju w niewielkich stężeniach. Związek ten powstaje w wyniku połączenia jonów cynku z protoporfiryną IX w reakcji katalizowanej przez ferrochelatazę, a jego stężenie jest podwyższone w stanach niedoboru żelaza [70]. Dotąd nie wiadomo, czy ZnPP pełni rolę endogennego inhibitora HO analogicznie do asymetrycznej dimetyloargininy będącej naturalnym inhibitorem syntazy tlenku azotu.

Powstająca w reakcji katalizowanej przez HO biliwerdyna jest zredukowana do bilirubiny przez reduktazę biliwerdynową (EC 1. 3. 1. 24). Tlenek węgla nie jest metabolizowany. Wiąże się z hemoglobiną, a następnie jest wydalany przez płuca. W prawidłowych warunkach około 0,5–1% hemoglobiny jest związane z CO pochodzenia endogennego. Żelazo jest wykorzystywane do syntezy innych hemoprotein lub magazynowane w połączeniu z ferrytyną.

Oksygenaza hemowa występuje w trzech izoformach: HO-1, HO-2 i HO-3, kodowanych przez odrębne geny. Izoenzym HO-1 o masie cząsteczkowej 32 kDa jest zaliczany do białek szoku termicznego (HSP32). W prawidłowych warunkach w dużych ilościach występuje on jedynie w śledzionie i wątrobie, gdzie bierze udział w katabolizmie hemoglobiny starzejących się erytrocytów. Ekspresja genu HO-1 wzrasta znamienne pod wpływem bardzo wielu czynników, takich jak podwyższona temperatura, promieniowanie





Ryc. 1. Reakcja katalizowana przez oksydazę hemową i działanie jej produktów, **BVR** – reduktaza biliwerdyny, **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species), **RNS** – reaktywne formy azotu (reactive nitrogen species), **IRP** – białko regulowane żelazem (iron-regulated protein)

ultrafioletowe typu A, stres oksydacyjny niedobór glutationu, metale ciężkie, hipoksja, hiperoksja oraz duże stężenie hemu lub hemoprotein. Temu ostatniemu należy przypisać znaczną ekspresję HO-1 w wątrobie i śledzionie – tkankach, w których hem jest uwalniany z erytrocytów w układzie siateczkowo-śródbłonkowym. Tlenek azotu (NO) także zwiększa ilość HO-1 w tkankach [29]. Czynniki indukujące mogą spowodować nawet 100-krotne zwiększenie HO-1 w komórkach. Regulacja aktywności tego enzymu odbywa się głównie na poziomie ekspresji genu (syntezy lub katabolizmu mRNA).

Izoenzym HO-2 o masie cząsteczkowej 36 kDa ma charakter konstytutywny. Najwięcej stwierdza się go w mózgu i jądrach, a w mniejszych ilościach w większości innych tkanek. HO-2 bierze udział w katabolizmie hemoprotein oraz wytwarza CO pełniący rolę mediatora, m. in. w układzie krążenia i nerwowym. Niewiele wiadomo na temat regulacji aktywności HO-2. W prawidłowych warunkach enzym ten nie jest wysycony substratem, ponieważ hem i pokrewne związki zwiększają jego aktywność zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Ekspresja HO-2 nie ulega zmianie pod wpływem czynników indukujących HO-1.

HO-3 o masie cząsteczkowej 33 kDa ma strukturę pierwszorzędową w 90% zbliżoną do HO-2 i występuje w wielu narządach, ale ma bardzo małą aktywność enzymatyczną [88]. Uważa się, że izoenzym ten pełni rolę białka wiążącego hem w komórkach.

MECHANIZMY DZIAŁANIA CO

W warunkach fizjologicznych, gdy dominującym izoenzymem jest HO-2, jedynym biologicznie aktywnym produktem reakcji katalizowanej przez oksygenazę hemową jest tlenek węgla. Chociaż endogenne wytwarzanie CO znane jest już od prawie 50 lat, ewentualne działanie biologiczne tego związku zaczęto brać pod uwagę dopiero po poznaniu tlenku azotu w latach 80. XX wieku. Tlenek węgla powstaje w ustroju w ilości około 500 $\mu\text{mol}/\text{dobę}$ (około 12 ml czystego CO), dla porównania tlenek azotu w ilości około 850 $\mu\text{mol}/\text{dobę}$. W warunkach fizjologicznych CO występuje w tkankach w stężeniach nanomolarnych. Podobnie jak NO, CO aktywuje rozpuszczalną cyklazę guanylową wiążąc się z grupą hemową tego enzymu. Tlenek węgla wykazuje jednak znacznie mniejszą aktywność w tym zakresie; NO zwiększa aktywność cyklazy prawie 400 razy, podczas gdy CO tylko 4 razy. Wynika to z innego mechanizmu działania obydwu gazów [67]. W prawidłowych warunkach jon Fe^{2+} w cząsteczce hemu jest związany przez 4 pierścienie pirolowe oraz grupę imidazolową jednej z reszt histydyny. NO wiąże się z jonom Fe^{2+} wiązaniem koordynacyjnym powodując zerwanie wiązania z grupą imidazolową i “wysunięcie” tego jonu ponad płaszczyznę cząsteczki hemu. Natomiast CO wiążąc się z Fe^{2+} nie powoduje zerwania tego wiązania, a kation żelazawy pozostaje w płaszczyźnie cząsteczki hemu. Jednak pomimo słabszej stymulacji oczyszczonej cyklazy guanylowej, CO znamienne

zwiększa syntezę cGMP w wielu komórkach. Może to być spowodowane dwoma przyczynami. Po pierwsze stwierdzono, że syntetyczny związek YC-1 wzmacnia stymulację cyklazy guanylowej przez CO i wskazuje się, że istnieją endogenne związki o podobnym działaniu. Ponadto w odróżnieniu od tlenu azotu, który bardzo szybko ulega inaktywacji, CO nie jest rozkładany w ustroju i może działać znacznie dłużej. Tlenek węgla uczestniczy w wielu mechanizmach zależnych od cGMP, takich jak rozszerzenie naczyń krwionośnych, hamowanie agregacji płytek i proliferacji komórek mięśniówki naczyni, czy udział w neurotransmisji.

Poza cyklazą guanylową, CO wykazuje powinowactwo do innych hemoprotein powodując hamowanie ich aktywności. Ma to znaczenie nie tylko w działaniu toksycznym tego związku, ale również w działaniu fizjologicznym. CO zmniejsza aktywność cytochromu P450 hamując powstawanie kwasu 20-hydroksyeikozatetraenowego (20-HETE) - związku silnie zewężającego naczynia. Innym mechanizmem działania CO jest niezależna od cGMP aktywacja cyklooksygenazy kwasów tłuszczowych i stymulacja syntezy PGE₂. W tym mechanizmie CO hamuje wydzielanie interleukiny 1β przez izolowane podwzgórze szczura. NO działa przeciwnie – stymuluje wydzielanie IL-1β w sposób zależny od cGMP [84]. Tlenek węgla aktywuje ponadto kinazę białkową p38 aktywowaną mitogenami (p38 MAPK), zmniejsza natomiast aktywność innych kinaz z tej grupy np. ERK1/ERK2. Ten szlak sygnałowy uczestniczy w działaniu przeciwzapalnym, antyproliferacyjnym i w hamowaniu apoptozy [11, 106, 130]. CO wiąże się też z grupami histydynowymi zależnych od wapnia kanałów potasowych, zwiększając czas ich otwarcia. Działanie to jest niezależne od wewnątrzkomórkowych mechanizmów przekazywania informacji i pośredniczy w działaniu CO na naczynia krwionośne, regulacji transportu jonów w kanalikach nerkowych, w regulacji pobudliwości chemoreceptorów tętnicznych oraz hamowaniu kurczliwości mięśniówki macicy [13, 76, 115, 151, 153]. CO może też wpływać bezpośrednio na ekspresję genów. U bakterii *Rhodospirillum rubrum* występuje czynnik transkrypcyjny CoxA zawierający hem, który w obecności CO aktywuje ekspresję genu dehydrogenazy tlenu węgla (CODH), utleniającej go do dwutlenku węgla [34]. Niedawno opisano pierwszy czynnik transkrypcyjny wrażliwy na CO w komórkach eukariotycznych. Jest to hemoproteina NPAS2, występująca w mózgu, odpowiedzialna za regulację cyklu dobowego, która wiąże CO, ale nie ma powinowactwa do tlenu ani tlenu azotu. Związanie CO hamuje oddziaływanie tego czynnika z DNA [23].

ZNACZENIE OCHRONNE HO-1

Wzmocniona ekspresja HO-1 w sytuacji narażenia komórek na stres sugeruje, że enzym ten może działać ochronnie. Wiele badań wykazało, że indukowanie HO-1 zmniejsza uszkodzenie spowodowane stresem oksydacyjnym, niedokrwieniem, hipoksją, hiperoksją lub zapaleniem. Mechanizm ochronnego działania HO-1 jest zróżnicowany i wielokierunkowy. HO-1 rozkłada wolny hem, który działa cytotoksycznie i prooksydacyjnie. Działanie cytoprotekcyjne wykazują też wszystkie produkty reakcji. Tlenek węgla rozszerza naczynia i hamuje agregację płytek krwi poprawiając ukrwienie tkanek. Chociaż działanie wazodylatacyjne CO jest słabsze niż NO, może mieć on szczególnie istotne znaczenie w warunkach stresu oksydacyjnego. W odróżnieniu od NO, tlenek węgla jest związkiem stabilnym i działa znacznie dłużej. Nie reaguje też z anionorodnikiem ponadtlenkowym, co w przypadku tlenu azotu prowadzi do powstawania toksycznego nadtlenoazotynu (ONO[•]). W warunkach stresu oksydacyjnego reakcja ta prowadzi do szybkiego unieczynienia NO, a to ogranicza jego działanie wazodylatacyjne, natomiast wpływ CO nie ulega wówczas osłabieniu. Stwierdzono również, że CO hamuje procesy apoptozy w wielu rodzajach komórek.

Powstające z hemu barwniki żółciowe, biliwerdyna i bilirubina, mają silne działanie antyoksydacyjne. Bilirubina jest najsilniejszym lipofilnym antyoksydantem, silniejszym nawet niż witamina E i hamuje wolnorodnikowe uszkodzenia błon lipidowych i lipoprotein osocza [103, 131, 132]. Bilirubina i biliwerdyna reagują także z reaktywnymi formami azotu, takimi jak np. nadtlenoazotyn [65]. Na istotne znaczenie bilirubiny wskazuje to, że powstaje ona z hydrofilnej a więc łatwiejszej do wydalania biliwerdyny, co jest niespotykanym kierunkiem przemian; większość związków przeznaczonych do wydalania jest metabolizowana do bardziej hydrofilnych produktów. Reduktaza biliwerdynowa (BVR) występuje tylko u ssaków. Sugerowano, że lipofilna bilirubina jest łatwiej wydalana przez łożysko. Jednak u płodu występuje inna postać BVR (typ B), katalizująca powstawanie bilirubiny IXβ, natomiast w okresie postnatalnym pojawia się izoenzym BVRA, katalizujący powstawanie izomeru bilirubiny IXα. Tak więc "hipoteza łożyskowa" może tłumaczyć jedynie istnienie BVRB. W wyniku reakcji z wolnymi rodnikami bilirubina ulega utlenieniu do biliwerdyny, która jest ponownie zredukowana przez BVR. Dzięki tym cyklicznym przemianom jedna cząsteczka bilirubiny może w krótkim czasie reagować z wieloma cząsteczkami oksydantów (ryc. 1). BVR odgrywa więc główną rolę w antyoksydacyjnym działaniu bilirubiny. Hamowanie



aktywności tego enzymu wzmagają toksyczność nadmiaru wodoru w stosunku do komórek nerwowych [8, 38]. Poza działaniem enzymatycznym, BVR aktywuje transkrypcję genu HO-1 [2]. Ilość BVR w tkankach wzrasta w stanach stresu oksydacyjnego, np. w mózgu po wywołaniu doświadczalnego niedokrwienia [108]. Ekspozycja komórek na H_2O_2 zwiększa aktywność BVR w wyniku fosforylacji cząsteczki enzymu [119]. BVR może być więc regulowana zarówno na poziomie ekspresji genu, jak i przez zmiany aktywności istniejących cząsteczek enzymu. Bilirubina chroni komórki śródbłonna oraz neurony przed uszkodzeniami wolnorodnikowymi *in vitro* [25, 94]. U szczurów z hiperbilirubinemią stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym – markera stresu oksydacyjnego – jest mniejsze niż u zwierząt kontrolnych [21]. Mniejsze natężenie stresu oksydacyjnego stwierdzono też u wcześniaków z hiperbilirubinemią [43]. Stężenie bilirubiny w osoczu wcześniaków ujemnie koreluje z występowaniem retinopatii, w której istotną rolę odgrywają wolne rodniki tlenowe [7]. Opisano przypadki przejściowego ustąpienia objawów trudnej do leczenia astmy oskrzelowej w czasie hiperbilirubinemii spowodowanej wirusowym zapaleniem wątroby typu B [104]. Dane te wskazują, że bilirubina jest nie tylko zbędnym produktem przemiany materii, ale również istotnym endogennym antyoksydantem.

Jony Fe^{2+} uwalnianie z hemu katalizują powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego w tzw. reakcji Fentona, mają więc silne działanie prooksydacyjne. Wykazano jednak, że uwalniane żelazo stymuluje syntezę ferrytyny – białka wiążącego żelazo o działaniu antyoksydacyjnym. Przy braku żelaza synteza ferrytyny jest hamowana przez białko IRP (iron regulatory protein) wiążące się z elementem odpowiedzi na żelazo (iron response element – IRE) w obrębie mRNA ferrytyny. Przy dużej zawartości żelaza w komórce wiąże się ono z IRP tworząc aktywny enzym cyklu Krebsa – akonitazę, a translacja mRNA ferrytyny ulega wówczas odhamowaniu [39]. Ponadto aktywacja HO-1 powoduje indukację “pompy żelazowej” – Fe-ATP-azy, która aktywnie usuwa jony Fe^{2+} z komórki [6].

Potwierdzeniem udziału HO-1 w metabolizmie żelaza są zmiany występujące u myszy pozbawionych genu tego enzymu ($HO-1^{-/-}$). Charakteryzują się one niskim stężeniem Fe w osoczu, niedokrwistością mikrocytarną (z niedoboru żelaza), a jednocześnie nagromadzeniem żelaza w komórkach wątroby i nerek, hepatosplenomegalią, powiększeniem węzłów chłonnych, zwiększoną leukocytozą i postępującym uszkodzeniem kłębuszków nerkowych [111, 112]. Fibroblasty tych zwierząt wytwarzają więcej reaktywnych form tlenu i są bardziej wrażliwe na działanie wolnych rod-

ników. Doświadczalny wstrząs septyczny wywołany podawaniem endotoksyn bakteryjnych powoduje martwicę wątroby i większą śmiertelność u myszy $HO-1^{-/-}$ niż u zwierząt kontrolnych. U myszy $HO-1^{-/-}$ występuje też zwiększona śmiertelność w wyniku uszkodzenia płuc spowodowanego niedokrwieniem i reperfuzją, czemu zapobiega oddychanie 0,2% CO [35]. U myszy $HO-2^{-/-}$ upośledzona jest czynność włókien układu autonomicznego unerwiających przewód pokarmowy i układ moczowo-płciowy, co przejawia się przyspieszeniem perystaltyki i zaburzeniami ejakulacji [12, 165]. HO-2 może też odgrywać pewną rolę w obronie antyoksydacyjnej, gdyż myszy $HO-2^{-/-}$ są bardziej wrażliwe na hiperoksję, pod wpływem której dochodzi do uszkodzenia płuc i gromadzenia w nich żelaza, pomimo jednoczesnego wzrostu ekspresji HO-1 [22].

Dotychczas opisano jeden przypadek niedoboru HO-1 u człowieka (6-letniego chłopca). Przejawiał się on opóźnieniem wzrostu, niedokrwistością hemolityczną, podwyższoną leukocytozą, małym stężeniem bilirubiny i dużym haptoglobiny oraz zwiększoną wrażliwością komórek na toksyczne działanie hemu [66, 105, 160]. W odróżnieniu od myszy $HO-1^{-/-}$, zmiany w nerkach polegają głównie na uszkodzeniu kanalików.

Należy jednak podkreślić, że oksygenazie hemowej nie można przypisywać wyłącznie ochronnych właściwości. W niektórych badaniach wykazano, że wzmożona ekspresja tego enzymu nasila uszkodzenie tkanek. Wszystkie produkty reakcji katalizowanej przez HO w większych stężeniach działają toksycznie, w wypadku tlenu węgla działanie toksyczne obserwowano już w stężeniach nieznacznie przekraczających wartości prawidłowe [137]. Działanie HO-1 jest zależne od dawki. Wykazano np., że 2-5-krotny wzrost aktywności tego enzymu chroni komórki przed toksycznym działaniem tlenu, natomiast wzrost ponad 15-krotny zwiększa jego toksyczność [135].

ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY NO I CO ORAZ SYNTETYZUJĄCYMI JE ENZYMAMI

NO i CO są prostymi dwuatomowymi gazami. Oba związki są syntetyzowane przez enzymy konstytutywne (śródbłonkowa i neuronalna syntaza NO oraz HO-2) i indukowalne (indukowalna syntaza NO i HO-1), chociaż iNOS nie jest regulowana przez tak wiele czynników jak HO-1. Zarówno NO, jak i CO wiążą się z grupami hemowymi białek i oba aktywują cytoplazmatyczną cyklazę guanylową. Oba gazy w niewielkich stężeniach są biologicznie aktywnymi mediatorami a w większych działają toksycznie. Poza tymi podobieństwami występują jednak istotne różnice. NO jest reaktywnym wolnym rodnikiem, podczas gdy CO jest

związkiem stabilnym. NO, w odróżnieniu od tlenu węgla wiąże się z grupami –SH białek i glutationu tworząc nitrozotiole (tab. 1).

Wiele danych wskazuje, że między obydwoimi związkami oraz syntetyzującymi je enzymami istnieją wielokierunkowe i skomplikowane interakcje (ryc. 2). Tlenek azotu może hamować aktywność oksygenazy hemowej, a także zwiększać ekspresję genu HO-1.

Tabela 1. Porównanie tlenu węgla i tlenu azotu

	CO	NO
Enzymy syntetyzujące		
konstytutywne	HO-2	ENOS, nNOS
indukowalne	HO-1	iNOS
Metabolizm	związek stabilny	wolny rodnik
Aktywacja cykazy guanylowej	tak (około 4 razy)	tak (około 400 razy)
Reakcja z grupami -SH	nie	tak
Reakcja z resztami histydynowymi	tak	nie
Reakcja z grupami hemowymi białek	tak	tak

W stanach zapalnych wzmożona ekspresja iNOS wyprzedza często pojawienie się HO-1, co wskazuje, że tlenek azotu może być odpowiedzialny za indukcję tego enzymu. Z kolei HO-1 rozkłada cząsteczkę hemu wchodzącą w skład syntazy tlenu azotu zmniejszając aktywność enzymu. Ponadto CO hamuje aktywność NOS wiążąc się z jej grupą hemową, a uwolnione w wyniku działania HO-1 jony Fe^{2+} hamują transkrypcję genu syntazy NO. Tak więc enzymy generujące NO i CO mogą być powiązane ze sobą na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Wykazano jednak, że w niektórych sytuacjach CO zwiększa ilość NO w tkankach wypierając go z połączeń z hemoproteinami [138]. Z kolei wzmożona synteza CO hamuje niekiedy działanie tlenu azotu, gdyż CO wiąże się z cyklazą guanylową zwiększając jej aktywność w niewielkim stopniu i uniemożliwiając wiązanie silniejszego aktywatora jakim jest NO [47].

REGULACJA NAPIĘCIA NACZYŃ I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO

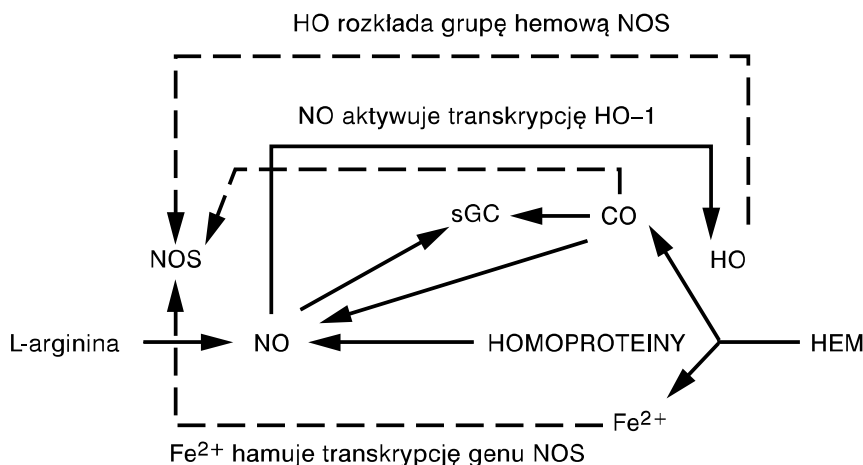
Od dawna znane było działanie wazodylatacyjne tlenu węgla, ponieważ w zatruciach tym związkiem obserwowano rozszerzenie naczyń obwodowych i spadek ciśnienia tętniczego. Badania ostatnich lat wskazują, że endogenny CO reguluje napięcie naczyń

krwionośnych. Zarówno komórki śródbłonna, jak i komórki mięśniówki naczyń zawierają HO-2, a pod wpływem czynników indukujących pojawia się w nich również HO-1 [164]. CO syntetyzowany przez komórki śródbłonna dyfunduje do sąsiadujących komórek mięśniowych, gdzie aktywuje cyklazę guanylową, zwiększa stężenie cGMP i powoduje ich relaksację [90]. Badania na izolowanych komórkach śródbłonna wykazały, że prawie 45% wytwarzanego przez nie cGMP zależy od tlenu węgla, a około 30% od tlenu azotu, proporcje te prawdopodobnie kształtują się jednak różnie w zależności od łożyska naczyniowego [61]. Jednak cGMP pośredniczy w działaniu CO tylko na niektóre naczynia np. aortę [45, 120, 152] czy naczynia płucne [96]. W innych naczyniach np. mózgowych [72], mięśniowych [166] i nerkowych [63] CO nie nasila syntezy cGMP, ale bezpośrednio aktywuje zależne od wapnia kanały potasowe w komórkach mięśniowych [153]. Podobne działanie ma też NO, ale ten ostatni aktywuje kanały wiążąc się z grupami –SH reszt cysteiny w obrębie podjednostki β , podczas gdy tlenek węgla wiąże się z resztami histydynowymi podjednostek α [157, 159]. Działanie to nie zależy od wewnątrzkomórkowych mechanizmów transmisji sygnałów, ponieważ obserwowano je w izolowanych błonach komórkowych. W niektórych przypadkach, jak np. w tętnicy ogonowej szczura [152] czy w przewodzie tętniczym [17] współistnieją oba te mechanizmy. Ostatnie badania wskazują, że endo- i egzogenny CO mogą działać wazodylatacyjnie w różny sposób. W tętnicy kręzkowej szczura lizynian hemu zwiększający syntezę endogennego CO w komórkach powoduje rozkurcz mięśniówki w mechanizmie niezależnym od cGMP, a egzogenny CO działa za pośrednictwem cGMP. Przypuszcza się, że CO jest syntetyzowany w komórce w pobliżu kanałów potasowych co umożliwia mu bezpośrednie działanie, natomiast podanie egzogennego CO, który osiąga podobne stężenie w całym cytosolu sprzyja aktywacji cykazy guanylowej [97].

Innym mechanizmem wazodylatacyjnego działania CO jest hamowanie syntezy 20-HETE – pochodnej kwasu arachidonowego zależnej od cytochromu P450 o silnym działaniu naczyniozężwężającym [154]. CO hamuje też syntezę endoteliny 1 przez komórki śródbłonna [18, 19, 91]. Hem i jego pochodne działają wazodylatacyjnie, podobnie jak CO, czemu zapobiegają inhibitory oksygenazy hemowej. Natomiast podawanie samych inhibitorów HO powoduje skurcz naczyń w badaniach *in vitro* i wzrost ciśnienia w badaniach *in vivo*, co świadczy o istotnej roli CO w regulacji napięcia naczyń w warunkach podstawowych [55, 69].

W niektórych badaniach wykazano jednak, że zarówno hem jak i tlenek węgla działają naczyniozężwężająco w





Ryc.2. Zależność między tlenkiem węgla i tlenkiem azotu oraz syntetyzującymi je enzymami; **NOS** – syntaza tlenku azotu, **sGC** – rozpuszczalna cyklaza guanylowa. Linie ciągłe oznaczają wpływ pobudzający, linie przerywane – wpływ hamujący

naczyniach z nieuszkodzonym śródbłonkiem [58, 59]. Wynika to z hamowania przez CO syntazy tlenku azotu lub z blokowania działania NO przez CO wiążący się z cyklazą guanylową. Po usunięciu śródbłonka lub farmakologicznym zahamowaniu syntazy tlenku azotu obserwowano działanie wazodylatacyjne. W izolowanych tętniczkach nerkowych CO w niewielkich stężeniach działa wazodylatacyjnie uwalniając NO z magazynów komórkowych (z połączeń z grupami hemowymi białek). W większych stężeniach, CO hamuje naczyniorozszerzające działanie acetylocholinoi zmniejszając aktywność syntazy NO [138]. Poznane dotychczas mechanizmy działania CO na naczynia krwionośne przedstawia tabela 2.

Szczególną rolę odgrywa tlenek węgla w regulacji napięcia naczyń zatokowych wątroby, w której NO właściwie nie jest wytwarzany. Inhibitory oksygenazy hemowej zwiększają o 30% opór naczyniowy w izolowanej perfundowanej wątrobie szczura, czemu zapobiega dodanie CO lub pochodnych cGMP do płynu inkubacyjnego [133]. Tlenek węgla rozszerza naczynia zatokowe wątroby aktywując cyklazę guanylową w perycytach tych naczyń (komórkach gwiazdzistych) [134]. CO jest wytwarzany w wątrobie w komórkach Browicza-Kupffera zawierających HO-1 oraz w hepatocytach zawierających HO-2 [36].

Niewiele wiadomo na temat regulacji HO-2 w komórkach śródbłonka. Podobnie jak NOS, jest ona aktywowana przez siły styczne do powierzchni śródbłonka spowodowane przepływem krwi, a także przez rozciąganie ściany naczynia [150]. Acetylocholina poprzez receptory muskarynowe zwiększa aktywność HO-2 i wytwarzanie CO w naczyniach płucnych

[164]. W naczyniach opony miękkiej kwas glutaminowy zwiększa aktywność HO-2 i syntezę CO [109, 116]. Pobudzające działanie glutaminianu na aktywność HO-2 jest blokowane przez inhibitory białkowych kinaz tyrozynowych i nasilane przez inhibitory fosfataz tyrozynowych, co świadczy o istotnej roli fosforylacji reszt tyrozyny w regulacji aktywności tego enzymu. Aktywatory kinazy białkowej C oraz zwiększenie stężenia wapnia w komórce również nasilają syntezę CO, odbywa się to jednak nie w wyniku wzrostu aktywności HO-2, ale wskutek zwiększenia stężenia hemu [33, 73]. Kwas glutaminowy jest neuroprzekaznikiem pobudzającym wydzielanym w dużych ilościach np. w stanach niedokrwienia mózgu oraz w stanach drgawkowych i może odgrywać ważną rolę w regulacji krążenia mózgowego w tych sytuacjach [113]. Wykazano również,

Tabela 2. Mechanizmy działania CO na naczynia krwionośne

wazodylatacyjne	
<ul style="list-style-type: none"> • wzrost stężenia cGMP • aktywacja kanałów potasowych • hamowanie aktywności cytochromu P450 i syntezy 20-HETE • uwalnianie NO z połączeń z hemoproteinami 	<ul style="list-style-type: none"> • wzrost stężenia cGMP • aktywacja kanałów potasowych • hamowanie aktywności cytochromu P450 i syntezy 20-HETE • uwalnianie NO z połączeń z hemoproteinami
wazokonstrykcyjne	
<ul style="list-style-type: none"> • hamowanie aktywności NOS • blokowanie działania NO na cyklazę guanylową 	<ul style="list-style-type: none"> • hamowanie aktywności NOS • blokowanie działania NO na cyklazę guanylową

że inkubacja izolowanych komórek śródbłonna w obecności estradiolu nasila ekspresję HO-2 i wydzielanie tlenu węgla [140]. Tlenek węgla może więc odgrywać rolę w ochronnym działaniu estrogenów na układ sercowo-naczyniowy. Hipoksja wzmacnia ekspresję HO-1 i syntezę CO w komórkach mięśniówki naczyń prowadząc do ich rozszerzenia, nie wpływa natomiast na ekspresję i aktywność HO-2 [90]. Tlenek azotu również wzmacnia ekspresję HO-1 w komórkach mięśniówki naczyń [29]. Podobne działanie na komórki śródbłonna wykazuje przedsiorkowy peptyd natriuretyczny [68]. Czynniki regulujące aktywność HO w naczyniach krwionośnych przedstawia tabela 3.

Tlenek węgla przyczynia się do utrzymania drożności przewodu tętniczego łączącego tętnicę płucną z aortą w okresie płodowym. Ekspresja HO-2 jest większa w komórkach mięśniowych tego przewodu niż w naczyniach zwierząt dorosłych. Przewód tętniczy rozszerza się pod wpływem hipoksji charakterystycznej dla okresu płodowego i kurczy przy prawidłowym stężeniu tlenu. Hemina powoduje rozszerzenie, a ZnPP skurcz przewodu tętniczego tylko w warunkach hipoksji, lecz nie przy prawidłowym stężeniu tlenu. Wskazuje to, że zwiększona synteza CO w okresie płodowym przyczy-

Tabela 3. Czynniki regulujące aktywność HO w naczyniach krwionośnych

HO-2
<ul style="list-style-type: none"> • siły hemodynamiczne • acetylocholina • kwas glutaminowy • estrogeny
HO-1
<ul style="list-style-type: none"> • hipoksja • NO • przedsiorkowy peptyd natriuretyczny • nadmierna podaż sodu • stres oksydacyjny, utlenione lipoproteiny osocza • cytokiny i czynniki wzrostowe

nia się do utrzymania drożności przewodu, zaś jej obniżenie po porodzie do jego zamknięcia [18].

W okresie stresu pooperacyjnego wzrasta znaczenie CO w regulacji napięcia naczyń kosztem tlenu azotu. U szczurów w pierwszych dniach po zabiegu operacyjnym zwiększona jest ekspresja HO-1 w wątrobie, aorticie i mięśniu sercowym, stężenie CO w tych tkankach oraz wydalanie bilirubiny z moczem. Podawanie inhibitorów HO w dawkach niewpływających na ciśnienie tętnicze w prawidłowych warunkach, działa hipertensyjnie w okresie pozabiegowym

wskazując na większe znaczenie CO w regulacji napięcia naczyń [95].

OŚRODKOWA REGULACJA KRAŻENIA

Niektóre badania wykazują, że wzrost ciśnienia spowodowany podawaniem inhibitorów oksygenazy hemowej zależy od aktywacji układu autonomicznego, co wskazuje na ośrodkowy mechanizm działania tych związków [57]. Wykazano, że wstrzyknięcie ZnPP do jądra pasma samotnego hamuje odruch z baroreceptorów tętnicznych, czyli zwolnienie akcji serca spowodowane wzrostem ciśnienia. Zapobiega temu jednoczesne wstrzykiwanie roztworu CO. Natomiast podanie hemu lub samego CO nasila odruch z baroreceptorów [80]. Jądro pasma samotnego jest ośrodkiem, w którym zakończenia neuronów aferentnych dochodzących z baroreceptorów łączą się synapsami z kolejnymi neuronami. Wzrost ciśnienia tętniczego powoduje aktywację tych neuronów i ich zakończenia wydzielają do szczeliny synaptycznej kwas glutaminowy, który zwiększa aktywność HO-2 i wzmacnia syntezę CO w neuronach postsynaptycznych [128]. Podawanie kwasu glutaminowego do jądra pasma samotnego powoduje bradykardię i spadek ciśnienia, czemu częściowo zapobiega ZnPP. Kwas glutaminowy działa depresyjnie na układ krążenia zarówno za pośrednictwem receptorów metabotropowych, jak i jonotropowych, ale tylko działanie przez receptory metabotropowe odbywa się za pośrednictwem CO [81].

REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO I APOPTOZY KOMÓREK NACZYŃ

Wzmocniona ekspresja HO-1 w komórkach śródbłonna powoduje ich proliferację, co jest pierwszym etapem angiogenezy. Jest to wynikiem pobudzającego wpływu CO na ekspresję czynnika wzrostu komórek śródbłonna (VEGF) [61, 136]. W przeciwieństwie do komórek śródbłonna, wzmocniona ekspresja HO-1 hamuje proliferację komórek mięśniówki naczyń [75, 92]. Inhibitory HO nasilają proliferację miocytów naczyń wywołaną angiotensyną II, PDGF, endoteliną i hipoksją, natomiast hemina ma odwrotne działanie [110]. CO w fizjologicznych stężeniach (100-200 ppm) hamuje proliferację miocytów za pośrednictwem cGMP. Mechanizm antyproliferacyjnego działania CO nie został dokładnie wyjaśniony. Nadekspresja HO-1 lub egzogeny CO powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego na granicy fazy G1 i S w wyniku hamowania ekspresji cykliny A i spadku aktywności kinazy białkowej od niej zależnej [27, 110]. CO wzmacnia też ekspresję białka p21 – inhibitora kinazy białkowej zależnej od cyklin typu 2 (cdk-2). CO zmniejsza też syntezę endoteliny 1



i PDGF przez komórki śródbłonka, przy czym działanie to nie zależy od cGMP [91].

HO-1 chroni komórki śródbłonka przed apoptozą indukowaną m. in. przez TNF- α . Za działanie to jest odpowiedzialny CO, nie zależy ono jednak od cyklicznego GMP ale od stymulacji kinaz MAPK [11]. W wypadku miocytów naczyń otrzymano sprzeczne wyniki. CO w stężeniach fizjologicznych hamuje apoptozę tych komórek za pośrednictwem cGMP [78], natomiast znacznie zwiększona dzięki manipulacjom genetycznym ekspresja HO-1 prowadzi do nasilenia apoptozy wskutek toksycznego działania bilirubiny [79].

WPŁYW CO NA PŁYTKI KRWI

Tlenek węgla wydzielany przez komórki śródbłonka stymuluje syntezę cGMP w płytkach krwi i hamuje ich agregację [15, 150]. Działania CO na układ krążenia przedstawiono w tabeli 4.

OKSYGENAZA HEMOWA I TLENEK WĘGLA W NADCIŚNIENIU TĘTNICZYM

Znaczenie oksygenazy hemowej i tlenku węgla było badane na kilku modelach nadciśnienia tętniczego. Szczury z samoistnym nadciśnieniem tętniczym (SHR) są często wykorzystywanym modelem doświadczalnym nadciśnienia uwarunkowanego genetycznie, które rozwija się u tych zwierząt między 4 a 8 tygodniem życia niezależnie od podaży sodu w diecie. Dostępne dane sugerują, że niedobór tlenu węgla może być istotnym czynnikiem w patogenezie nadciśnienia u szczurów SHR. Ekspresja HO-1 i rozpuszczalnej cykazy guanylowej, a także stężenie cGMP w ścianach naczyń są mniejsze u szczurów SHR w początkowej fazie rozwoju nadciśnienia. Co więcej, niedobór HO-1

Tabela 4. Działanie CO na układ krążenia

- rozszerzenie naczyń
- stymulacja proliferacji komórek śródbłonka
- hamowanie proliferacji komórek mięśniowych
- hamowanie wydzielania czynników wzrostowych
- hamowanie agregacji płytek
- hamowanie apoptozy komórek śródbłonka i mięśniówki
- ośrodkowe działanie depresyjne

występuje już u zwierząt 4-tygodniowych gdy ciśnienie jest jeszcze prawidłowe, co wskazuje, że zmniejszona ekspresja tego enzymu jest zjawiskiem pierwotnym a nie wynika z nadciśnienia [99, 100, 101, 102]. Niedobór oksygenazy hemowej może powodować rozwój nadciśnienia nie tylko w wyniku niedoboru CO, ale również nadmiernej aktywności monoooksygenazy cytochromu P450 – enzymu katalizującego powstawanie 20-HETE z kwasu arachidonowego. U szczurów SHR aktywność cytochromu P450 i stężenie 20-HETE są podwyższone, a podawanie chlorku cyny – silnego induktora HO-1 – normalizuje te zaburzenia oraz przywraca prawidłowe ciśnienie krwi [20, 31, 118]. Podawanie heminy zwiększa ekspresję HO-1 i rozpuszczalnej cykazy guanylowej oraz powoduje spadek ciśnienia u młodych szczurów SHR [56, 74, 99, 100, 102]. Podawanie innego induktora HO-1, protoporfiryny kobaltowej, wzmacnia ekspresję HO-1 w korze i części zewnętrznej rdzenia nerek, obniża stężenie 20-HETE i również powoduje obniżenie ciśnienia [1]. Wprowadzenie genu HO-1 do tkanki śródmiąższowej nerki u 5-dniowych szczurów SHR powoduje długotrwały wzrost ekspresji enzymu, zwłaszcza w naczyniach doprowadzających krew do kłębuszków oraz w pętli Henlego. Prowadzi to do spadku ilości 20-HETE wydalanego z moczem i zapobiega rozwojowi nadciśnienia [37]. Podawanie ciężarnym samicom SHR wirusów zawierających rekombinowany ludzki gen HO-1 zapobiega rozwojowi nadciśnienia u potomstwa [117]. W późniejszym wieku u szczurów SHR dochodzi do wzrostu ilości HO-1 i cykazy guanylowej w naczyniach, co ma prawdopodobnie charakter kompensacyjny i jest spowodowane bodźcami hemodynamicznymi. Pomimo to nie następuje normalizacja ciśnienia, w związku z “odczuleniem” białek regulowanych przez cGMP [100, 125]. Leczenie induktorami HO-1, chociaż dodatkowo zwiększa ekspresję enzymu, nie powoduje obniżenia ciśnienia u dorosłych osobników [100, 101].

Szczury szczepu Dahl z sodowrażliwym nadciśnieniem tętniczym (DS) są modelem nadciśnienia indukowanego wysoką podażą sodu. U zwierząt tych ciśnienie pozostaje prawidłowe, jeżeli karmione są one dietą o prawidłowej zawartości sodu, natomiast zwiększenie jego podaży powoduje rozwój nadciśnienia. U kontrolnego szczepu DR nadciśnienie nie rozwija się nawet przy dużej podaży sodu. U szczurów DS stosowanie diety bogatosodowej powoduje wzrost ekspresji HO-1 w komórkach mięśniówki aorty oraz zwiększa ilość wytwarzanego CO ocenianą na podstawie stężenia hemoglobiny tlenkowęgłowej we krwi. Natomiast u szczurów DR nie dochodzi do wzrostu ekspresji HO-1 pod wpływem nadmiaru sodu. Ponadto szczury DS na diecie bogatosodowej charakteryzują się

mniejszym udziałem NO w regulacji napięcia naczyń, o czym świadczy mniejsze działanie presyjne inhibitora syntezy NO, L-NAME, oraz upośledzone działanie naczyniorozszerzające acetylocholino. Podawanie inhibitora oksygenazy hemowej, protoporfiryny kobaltowej, obniża ciśnienie u szczurów DS oraz znosi różnice w działaniu L-NAME i acetylocholino między obydwoma szczepami. Dane te wskazują, że nadmiar HO-1 spowodowany dużą podażą sodu może być przyczyną rozwoju nadciśnienia u szczurów DS. Wzmocniona ilość HO-1 w naczyniach upośledza syntezę tlenu azotu w wyniku działania następujących mechanizmów: 1) HO-1 rozkłada hem będący grupą prostetyczną NOS, 2) jony Fe^{2+} uwolnione z hemu hamują transkrypcję genu NOS, 3) CO bezpośrednio hamuje aktywność NOS, 4) CO wiąże się z cyklazą guanylową i uniemożliwia działanie NO, a sam jest słabszym jej aktywatorem [60]. Potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki badań myszy transgenicznymi, u których nadmierna ekspresja HO-1 w komórkach mięśniówki naczyń powoduje rozwój nadciśnienia [46]. U szczurów rasy Wistar karmionych długotrwale dietą bogatosodową inhibitory oksygenazy hemowej powodują spadek ciśnienia w odróżnieniu od zwierząt kontrolnych, u których indukują jego wzrost. Świadczy to o tym, że u zwierząt karmionych dietą bogatosodową oksygenaza hemowa działa w kierunku podwyższenia ciśnienia [26]. Tak więc nadmierna aktywność HO może się przyczyniać do rozwoju nadciśnienia indukowanego dietą bogatosodową także przy braku uwarunkowań genetycznych.

Znaczenie oksygenazy hemowej badano również na modelach nadciśnienia nieuwarunkowanego genetycznie. Jednym z najczęściej stosowanych jest długotrwale podawanie angiotensyny. W izolowanych komórkach mięśniówki naczyń angiotensyna II zmniejsza ekspresję HO-1 poprzez działanie na receptory AT1 i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia [52]. Natomiast przewlekłe podawanie angiotensyny II *in vivo* wzmaga ekspresję HO-1 w aortalnej [51], sercu [54] i nerkach [4, 41, 53]. Jest to prawdopodobnie reakcją obronną wywołaną nadciśnieniem, ograniczającą natężenie stresu oksydacyjnego indukowanego angiotensyną II oraz związane z tym powikłania narządowe. Podawanie heminy zmniejsza, natomiast inhibitory HO-1 nasilają zmiany morfologiczne i czynnościowe w nerkach u zwierząt otrzymujących angiotensynę II [4].

Nadciśnienie indukowane usunięciem jednej nerki oraz zwężeniem tętnicy zaopatrującej drugą nerkę (one kidney one clip – 1K1C) jest modelem nadciśnienia nerkopochodnego. W pierwszym etapie wzrost ciśnienia występuje w wyniku aktywacji układu renina-angiotensyna, jednak później jego aktywność spada a

nadciśnienie utrzymuje się wskutek retencji sodu i zwiększenia objętości krwi krążącej. Podwiązanie tętnicy nerkowej zwiększa ekspresję HO-1 w nerce i sercu. Wysokość ciśnienia tętniczego w modelu 1K1C jest taka sama u myszy HO-1^{+/+} i HO-1^{-/-}, ale u tych ostatnich bardziej nasilony jest przerost mięśnia sercowego i uszkodzenie nerek [158]. W nadciśnieniu indukowanym przewlekłym podawaniem L-NAME u szczurów wzrasta ekspresja HO-1 i HO-2 w aortalnej, lewej komorze i w nerkach. Podawanie heminy powoduje większy spadek, a inhibitory HO większy wzrost ciśnienia u zwierząt otrzymujących L-NAME niż u szczurów kontrolnych, co świadczy o większej roli CO w utrzymaniu napięcia naczyń [146].

Przedstawione dane wskazują, że zarówno niedobór (szczury SHR) jak i nadmiar (szczury DS) oksygenazy hemowej i tlenu węgla mogą się przyczyniać do rozwoju nadciśnienia uwarunkowanego genetycznie. W innych modelach nadciśnienia ekspresja HO-1 w naczyniach, sercu i w nerkach jest zwiększona, co prawdopodobnie jest reakcją kompensacyjną ograniczającą wzrost ciśnienia i zapobiegającą powikłaniom narządowym.

Nadciśnienie tętnicze jest jednym z przewlekłych powikłań cukrzycy. U szczurów z doświadczalną cukrzycą nie zmienia się ilość HO-1 i HO-2 w naczyniach, ale upośledzone jest działanie naczyniorozszerzające CO. U zdrowych zwierząt CO rozszerza tętnicę ogonową za pośrednictwem cGMP i przez aktywację kanałów potasowych, natomiast w cukrzycy ten drugi mechanizm jest upośledzony prawdopodobnie w wyniku nieenzymatycznej glikacji tych kanałów [156].

Jak dotychczas niewiele wiadomo na temat zachowania się oksygenazy hemowej w nadciśnieniu u człowieka. Wykazano jedynie, że ilość wydychanego CO jest obniżona u kobiet z nadciśnieniem indukowanym ciążą, co może wskazywać na znaczenie niedoboru CO w jego patogenezie [9].

Oksygenaza hemowa i tlenek węgla w patogenezie miażdżycy

W obrębie zmian miażdżycowych stwierdzono obecność HO-1 zarówno u królików [98] jak i u ludzi [155]. Czynnikiem indukującym HO-1 w blaszkach miażdżycowych mogą być oksydowane lipoproteiny osocza, rodnik nadtlenoazotynowy, angiotensyna II, hem uwolniony z uszkodzonych komórek oraz cytokiny i czynniki wzrostowe, takie jak PDGF i TGF- β [30, 48].

Oksygenaza hemowa może odgrywać istotną rolę w hamowaniu rozwoju zmian miażdżycowych. CO hamuje proliferację komórek mięśniówki naczyń i



agregację płytek krwi, zmniejsza syntezę czynników wzrostowych przez komórki śródbłonna [91], ponadto działa przeciwzapalnie [106]. Indukowanie HO-1 w hodowli komórek śródbłonna i mięśniówki naczyń hamuje migrację monocytów [48]. Istotne znaczenie przeciwmiażdżycowe ma prawdopodobnie antyoksydacyjne działanie bilirubiny. Indukcja HO-1 hamuje ekspresję białek adhezyjnych na komórkach śródbłonna i przyleganie do nich leukocytów, co jest pierwszym etapem rozwoju blaszki miażdżycowej. Działanie to wynika ze wzmożonego wytwarzania bilirubiny, ponieważ egzogenna bilirubina działa podobnie, natomiast CO nie ma takich właściwości [42]. Natomiast hamowanie aktywności HO wzmacnia ekspresję białek adhezyjnych [149]. Małe stężenie bilirubiny w osoczu jest niezależnym czynnikiem ryzyka choroby niedokrwiennej serca [24, 87]. W zespole Gilberta – genetycznie uwarunkowanej łagodnej hiperbilirubinemii ryzyko zachorowania na chorobę niedokrwinną serca jest kilkakrotnie zmniejszone [147]. Należy również zaznaczyć, że króliki niemające BVR są szczególnie podatne na indukowanie miażdżycy dietą bogatą w cholesterol.

Badania *in vivo* wykazują, że indukcja farmakologiczna lub dostarczenie genu HO-1 zmniejsza nasilenie miażdżycy w różnych modelach zwierzęcych, takich jak np. myszy z nokautowanym genem receptora LDL [49], myszy z niedoborem receptora apoproteiny E [62] oraz króliki Watanabe z wrodzoną hiperlipidemią [50]. Podawanie CO drogą wziewną zmniejsza nasilenie miażdżycy w przeszczepionej aortic [107]. Wykazano, że homocysteina zapobiega indukowaniu HO-1 przez tlenek azotu w ścianie naczyń krwionośnych [122]. Zakładając, że HO-1 działa przeciwmiażdżycowo, efekt ten może być kolejnym mechanizmem nasilonej aterogenezy spowodowanej hiperhomocysteinemią.

RESTENOZA PO ANGIOPLASTYCE WIĘNCOWEJ

W związku z coraz szerszym stosowaniem leczenia zabiegowego w ostrych zespołach wieńcowych, istotnym problemem klinicznym staje się nawrót zwężenia (restenoza) po wykonaniu angioplastyki. Przyczyną restenozy jest nagromadzenie komórek mięśniowych w błonie wewnętrznej ściany naczynia. Indukcja HO-1 przez podawanie heminy hamuje rozwój zwężenia wywołanego doświadczalnym uszkodzeniem tętnicy szyjnej u szczurów [3, 139, 143]. Podobnie wpływa nadekspresja HO-1 za pomocą wektora wirusowego [27, 144]. Natomiast delecja genu HO-1 lub farmakologiczne hamowanie jego aktywności nasilają rozrost błony wewnętrznej uszkodzonego naczynia [27, 139]. Ciekawe, że wziewne podawanie CO w niewielkich stężeniach tylko przez 1 godzinę przed wykonaniem

doświadczalnej angioplastyki znamienne hamowało rozwój restenozy [107].

POLIMORFIZM GENU HO-1 A MIAŻDZYCA

W rejonie promotorowym genu HO-1 znajdują się powtarzające się sekwencje GT, występujące w różnych ilościach u różnych osób. Mniejsza ilość tych sekwencji wiąże się z bardziej nasiloną transkrypcją genu i większą aktywnością enzymu. Wykazano, że u osób z długimi sekwencjami HO-1 częściej występuje choroba niedokrwienności serca [14, 64], restenoza po angioplastyce wieńcowej [32, 123] oraz tętniak aorty brzusznej [124]. Sugeruje to, że mała aktywność HO-1 sprzyja rozwojowi miażdżycy.

NIEDOKRWIENIE MIĘŚNIA SERCOWEGO

Niedokrwienie z następową reperfuzją wzmacnia ekspresję HO-1 w izolowanym mięśniu sercowym szczura [86]. Jest to wynikiem stresu oksydacyjnego towarzyszącego reperfuzji, ponieważ pojawieniu się HO-1 zapobiega perfuzja roztworem zawierającym enzymy antyoksydacyjne. Wzmoczoną ekspresję HO-1 obserwowano też w sercu poddanym niedokrwieniu i reperfuzji *in situ* [71, 127]. Farmakologiczne indukowanie HO-1 przed epizodem niedokrwienia zmniejsza rozmiar zawału, natężenie stresu oksydacyjnego w niedokrwionym mięśniu oraz częstotliwość występowania arytmii komorowych w okresie reperfuzji [40, 85]. Mniejsze uszkodzenie mięśnia sercowego wywołane niedokrwieniem obserwowano u myszy transgenicznych oraz szczurów, którym do mięśnia sercowego wszczepiono dodatkowe kopie genu HO-1 [89, 148, 162]. U myszy HO-1^{+/-} niedokrwienie i reperfuzja powodują bardziej nasilone uszkodzenie mięśnia sercowego przejawiające się większym obszarem martwicy, podwyższoną aktywnością kinazy kreatynowej i upośledzeniem kurczliwości [163]. Za ochronne działanie HO-1 w stanie niedokrwienia może być odpowiedzialna bilirubina, gdyż perfuzja izolowanego serca roztworami tego związku działa podobnie jak indukcja HO-1 [16]. Inne badania sugerują natomiast, że to tlenek węgla zapobiega arytmii komorowym występującym w izolowanym sercu poddanym niedokrwieniu i reperfuzji [5].

PRZEROST I PRZEBUDOWA MIĘŚNIA SERCOWEGO. NIEWYDOLNOŚĆ KRAŻENIA

Przerost mięśnia sercowego wywołany hipoksją lub zwężeniem tętnicy płucnej wiąże się ze wzmożoną ekspresją HO-1 w kardiomiocytach [114]. Znaczenie HO-1 w procesie przerostu i przebudowy mięśnia sercowego nie jest jednoznacznie wyjaśnione. U myszy HO^{-/-} hipoksja powoduje bardziej nasilony przerost

prawej komory niż u zwierząt kontrolnych [161]. W odróżnieniu od myszy kontrolnych, u myszy HO-1^{-/-} pod wpływem przewlekłej hipoksji występują ogniska martwicy mięśnia prawej komory oraz jej znaczne poszerzenie. Podawanie chlorku cyny – induktora HO-1 – zmniejsza nasilenie przerostu lewej komory u szczurów SHR, nawet w dawkach niewpływających na ciśnienie tętnicze [126]. Dane te wskazują, że HO-1 ogranicza proces przerostu. W marskości wątroby spowodowanej podwiązaniem przewodu żółciowego u szczura wzrasta ekspresja HO-1 w mięśniu sercowym i stężenie cGMP. Może to być następstwem działania endotoksyn bakteryjnych, cytokin zapalnych lub aktywacji układu współczulnego. Wzrost ekspresji HO-1 wiąże się z upośledzeniem kurczliwości mięśnia sercowego, czemu zapobiega podawanie ZnPP, natomiast egzogenny CO zmniejsza kurczliwość izolowanych mięśni brodawkowatych. Sugeruje to, że nadmiar CO jest jednym z mechanizmów zmniejszonej wydolności mięśnia sercowego u chorych z marskością wątroby [77].

TRANSPLANTACJA SERCA

Istnieją dane wskazujące na związek HO-1 z odrzucaniem przeszczepów, w tym przeszczepów serca. Serca myszy HO^{-/-} i HO-1^{+/-} przeszczepiane szczurom ulegają odrzuceniu znacznie wcześniej niż serca pobrane od zwierząt kontrolnych. W przeszczepionych sercach HO-1^{-/-} stwierdza się nasiloną apoptozę miocytów, nacieki leukocytarne, agregację płytek i tworzenie zakrzepów w naczyniach [129]. Podawanie protoporfiryny cynowej (inhibitora HO) zmniejsza przeżywalność przeszczepionych serc, natomiast wziewnie stosowany CO działa korzystnie [121]. Dane te wskazują, że HO-1 działa ochronnie w stosunku do przeszczepu. Transfer genu HO-1 za pomocą wektora wirusowego hamuje proces odrzucania przeszczepu u szczura [141].

PODSUMOWANIE

Wiele danych wskazuje, że ekspresja HO-1 wzrasta w sytuacji narażenia komórek na stres, i że enzym ten ma działanie ochronne. Korzystny wpływ induktorów HO-1 wskazuje jednak, że naturalny wzrost ekspresji enzymu często nie chroni dostatecznie tkanek. W zależności od modelu doświadczalnego, zarówno CO jak i barwniki żółciowe mogą odpowiadać za działanie ochronne HO-1. Nadmierna ekspresja enzymu nasila jednak uszkodzenie tkanek przede wszystkim w wyniku uwalniania prooksydacyjnie działającego żelaza, chociaż CO i bilirubina w większych stężeniach też działają toksycznie. Niedobór oksygenazy hemowej może się przyczyniać do rozwoju niektórych chorób układu krążenia, takich jak nadciśnienie tętnicze czy miażdżyca. Ochronne działanie HO-1

wzbudza duże nadzieje terapeutyczne. Jednak pomimo obiecujących wyników wielu badań doświadczalnych, perspektywy zastosowań klinicznych wydają się nadal odległe. Związki indukujące HO-1 działają nieswoiście, gdyż wpływają też na inne białka szoku termicznego, a także – jak sole metali ciężkich – jednocześnie działają toksycznie. Poza tym farmakologiczna indukcja HO-1 jest krótkotrwała, a więc może znaleźć zastosowanie jedynie w stanach ostrych. Bardziej obiecujące są próby zwiększania aktywności HO-1 przez manipulacje genetyczne, zwłaszcza że można by to przeprowadzać miejscowo np. w czasie koronarografii. Chociaż wziewnie podawany CO działa korzystnie w wielu modelach doświadczalnych, zastosowanie go tą drogą u człowieka nie wydaje się możliwe ze względu na toksyczność i trudności w uzyskaniu ściśle kontrolowanych stężeń tego związku. Opisano związki nieorganiczne uwalniające CO w warunkach fizjologicznych [93], które mogłyby być stosowane w terapii, zwłaszcza miejscowo. Na uwagę zasługują też związki wzmagające działanie CO na cyklazę guanylową, takie jak np. YC-1, który skutecznie hamuje rozwój restenozy w uszkodzonych naczyniach w warunkach doświadczalnych [142]. Należy jednak pamiętać, że będzie on nasilał jedynie działania CO zależne od cGMP.

Kontrowersje wzbudza znaczenie HO-2 i konstytutywna rola tlenu węgla jako mediatora w warunkach fizjologicznych. Chociaż CO wykazuje aktywność biologiczną, wydaje się, że jego rola bywa niekiedy przeceniana, gdyż ze względu na podobny mechanizm działania zbyt pochopnie przypisuje mu się wiele funkcji ekstrapolując dane uzyskane dla tlenu azotu. Niewiele dotychczas wiadomo o mechanizmach regulujących aktywność HO-2, podczas gdy wszystkie enzymy syntetyzujące biologicznie aktywne mediatory są precyzyjnie regulowane. CO nie jest katabolizowany w ustroju, co jest niezwykłą cechą wśród wtórnych przekazników, znacznie utrudniającą regulację jego działania. Jednak niezależnie od wątpliwości, badania z tego zakresu rodzą wiele fascynujących problemów. Czy metaloporfiryny są endogennymi inhibitorami HO o znaczeniu fizjologicznym, a jeżeli tak, to czy i jak ich metabolizm jest regulowany? Czy istnieją endogenne związki wzmagające aktywację cykazy guanylowej przez CO? Jakie mechanizmy regulują aktywność reduktazy biliwerdynowej – enzymu o podstawowym znaczeniu dla działania antyoksydacyjnego barwników żółciowych? Są to tylko niektóre pytania, jakie niewątpliwie zostaną wyjaśnione w kolejnych badaniach.



PIŚMIENICTWO

- [1] Abraham N. G., Botros F. T., Rezzani R., Rodella L., Bianchi R., Goodman A. I.: Differential effect of cobalt protoporphyrin on distributions of heme oxygenase in renal structure and on blood pressure in SHR. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2002, 48: 895-902.
- [2] Ahmad Z., Salim M., Maines M. D.: Human biliverdin reductase is a leucine zipper-like DNA-binding protein and functions in transcriptional activation of heme oxygenase-1 by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 9226-9232
- [3] Aizawa T., Ishizaka N., Taguchi J., Kimura S., Kurokawa K., Ohno M.: Balloon injury does not induce heme oxygenase-1 expression, but administration of hemin inhibits neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 261: 302-307.
- [4] Aizawa T., Ishizaka N., Taguchi J., Nagai R., Mori I., Tang S. S., Ingelfinger J. R., Ohno M.: Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats: possible role in renoprotection. *Hypertension* 2000, 35: 800-806.
- [5] Bak I., Papp G., Turoczi T., Varga E., Szendrei L., Vecsernyes M., Joo F., Tosaki A.: The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 33: 639-648.
- [6] Baranano D. E., Wolosker H., Bae B. I., Barrow R. K., Snyder S. H., Ferris C. D.: A mammalian iron ATPase induced by iron. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 15166-15173.
- [7] Baranano D. E., Snyder S. H.: Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98: 10996-11002.
- [8] Baranano D. E., Rao M., Ferris C. D., Snyder S. H.: Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99: 16093-16098.
- [9] Baum M., Schiff E., Kreiser D., Dennery P. A., Stevenson D. K., Rosenthal T., Seidman D. S.: End-tidal carbon monoxide measurements in women with pregnancy-induced hypertension and preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000, 183: 900-903.
- [10] Borowicz K. K., Kleinrok Z.: Biologiczna rola tlenku węgla w czynności układu nerwowego. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1996, 50: 81-94.
- [11] Brouard S., Otterbein L. E., Anrather J., Tobiasch E., Bach F. H., Choi A. M., Soares M. P.: Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 2000, 192: 1015-1026.
- [12] Burnett Ex. L., Johns E. G., Kriegsfeld Ex. J., Klein Ex. L., Calvin Ex. C., Demas E. E., Schramm E. P., Toneyawa E., Nelson E. J., Snyder S. H., Poss K. D.: Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nat. Med.* 1998, 4: 84-87.
- [13] Carvajal J. A., Thompson L. P., Weiner C. P.: Chorion-induced myometrial relaxation is mediated by large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel opening in the guinea pig. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003, 188: 84-91.
- [14] Chen Y. H., Lin S. J., Lin M. W., Tsai H. L., Kuo S. S., Chen J. W., Charng M. J., Wu T. C., Chen L. C., Ding Y. A., Pan W. H., Jou Y. S., Chau L. Y.: Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum. Genet.* 2002, 111: 1-8.
- [15] Christodoulides N., Durante W., Kroll M. H., Schafer A. I.: Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation* 1995, 91: 2306-2309.
- [16] Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Kaur H., Green C. J., Motterlini R.: Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000, 278: H643-H651.
- [17] Coceani F., Kelsey L., Seidlitz E.: Carbon monoxide-induced relaxation of the ductus arteriosus in the lamb: evidence against the prime role of guanylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 1996, 118: 1689-1696.
- [18] Coceani F., Kelsey L., Seidlitz E., Marks G. S., McLaughlin B. E., Vreman H. J., Stevenson D. K., Rabinovitch M., Ackerley C.: Carbon monoxide formation in the ductus arteriosus in the lamb: implications for the regulation of muscle tone. *Br. J. Pharmacol.* 1997, 120: 599-608.
- [19] Coceani F., Kelsey L.: Endothelin-1 release from the lamb ductus arteriosus: are carbon monoxide and nitric oxide regulatory agents? *Life Sci.* 2000, 66: 2613-2623.
- [20] Da Silva J. L., Tiefenthaler M., Park E., Escalante B., Schwartzman M. L., Levere R. D., Abraham N. G.: Tin-mediated heme oxygenase gene activation and cytochrome P450 arachidonate hydroxylase inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Med. Sci.* 1994, 307: 173-181.
- [21] Dennery P. A., McDonagh A. F., Spitz D. R., Rodgers P. A., Stevenson D. K.: Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 19: 395-404.
- [22] Dennery P. A., Spitz D. R., Yang G., Tatarov A., Lee C. S., Shegog M. L., Poss K. D.: Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 1998, 101: 1001-1011.
- [23] Dioum E. M., Rutter J., Tuckerman J. R., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A., McKnight S. L.: NPAS2: a gas-responsive transcription factor. *Science* 2002, 298: 2385-2387.
- [24] Djousse L., Levy D., Cupples L. A., Evans J. C., D'Agostino R. B., Ellison R. C.: Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. *Am. J. Cardiol.* 2001, 87: 1196-1200.
- [25] Dore S., Takahashi M., Ferris C. D., Zakhary R., Hester L. D., Guastella D., Snyder S. H.: Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96: 2445-2450.
- [26] dos Santos E. A., Yamaguchi G. A., Heimann J. C.: Effect of the heme/heme oxygenase pathway on the relationship between salt consumption and blood pressure. *J. Hypertens.* 1998, 16: 1965-1969.
- [27] Duckers H. J., Boehm M., True A. L., Yet S. F., San H., Park J. L., Clinton Webb R., Lee M. E., Nabel G. J., Nabel E. G.: Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat. Med.* 2001, 7: 693-698.
- [28] Dulak J., Jozkowicz A.: Carbon monoxide - a "new" gaseous modulator of gene expression. *Acta Biochim. Pol.* 2003, 50: 31-47.
- [29] Durante W., Kroll M. H., Christodoulides N., Peyton K. J., Schafer A. I.: Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1997, 80: 557-564.
- [30] Durante W., Peyton K. J., Schafer A. I.: Platelet-derived growth factor stimulates heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Biol.* 1999, 19: 2666-2672.
- [31] Escalante B., Sacerdoti D., Davidian M. M., Laniado-Schwartzman M., McGiff J. C.: Chronic treatment with tin normalizes blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1991, 17: 776-779.
- [32] Exner M., Schillinger M., Minar E., Mlekusch W., Schlerka G., Haumer M., Mannhalter C., Wagner O.: Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with restenosis after percutaneous transluminal angioplasty. *J. Endovasc. Ther.* 2001, 8: 433-440.
- [33] Fiumana E., Parfenova H., Jagger J. H., Leffler C. W.: Carbon monoxide mediates vasodilator effects of glutamate in isolated pressurized cerebral arterioles of newborn pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003, 284: H1073-H1079.
- [34] Foresti R., Motterlini R.: The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic. Res.* 1999, 31: 459-475.

- [35] Fujita T., Toda K., Karimova A., Yan S. F., Naka Y., Yet S. F., Pinsky D. J.: Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat. Med.* 2001, 7: 598-604.
- [36] Goda N., Suzuki K., Naito M., Takeoka S., Tsuchida E., Ishimura Y., Tamatani T., Suematsu M.: Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J. Clin. Invest.* 1998, 101: 604-612.
- [37] Goodman A. I., Quan S., Yang L., Synghal A., Abraham N. G.: Functional expression of human heme oxygenase-1 gene in renal structure of spontaneously hypertensive rats. *Ex. Biol. Med.* (Maywood) 2003, 228: 454-458.
- [38] Greenberg D. A.: The jaundice of the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99: 15837-15839.
- [39] Hanafy K. A., Krumenacker J. S., Murad F.: NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit.* 2001, 7: 801-819.
- [40] Hangaishi M., Ishizaka N., Aizawa T., Kurihara Y., Taguchi J., Nagai R., Kimura S., Ohno M.: Induction of heme oxygenase-1 can act protectively against cardiac ischemia/reperfusion in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 279: 582-588.
- [41] Haugen E. N., Croatt A. J., Nath K. A. 2000: Angiotensin II induces renal oxidant stress in vivo and heme oxygenase-1 in vivo and in vitro. *Kidney Int.* 58: 144-152.
- [42] Hayashi S., Takamiya R., Yamaguchi T., Matsumoto K., Tojo S. J., Tamatani T., Kitajima M., Makino N., Ishimura Y., Suematsu M.: Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ. Res.* 1999, 85: 663-671.
- [43] Hegyi T., Goldie E., Hiatt M.: The protective role of bilirubin in oxygen-radical diseases of the preterm infant. *J. Perinatol.* 1994, 14: 296-300.
- [44] Herman Z.S.: Carbon monoxide: a novel neural messenger or putative neurotransmitter? *Pol. J. Pharmacol.* 1997, 49: 1-4.
- [45] Hussain A. S., Marks G. S., Brien J. F., Nakatsu K.: The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1, 2, 4]oxadiazolo[4, 3- α]quinoxalin-1-one (ODQ) inhibits relaxation of rabbit aortic rings induced by carbon monoxide, nitric oxide, and glyceryl trinitrate. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1997, 75: 1034-1037.
- [46] Imai T., Morita T., Shindo T., Nagai R., Yazaki Y., Kurihara H., Suematsu M., Katayama S.: Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. *Circ. Res.* 2001, 89: 55-62.
- [47] Ingi T., Cheng J., Ronnett G. V.: Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron.* 1996, 16: 835-842.
- [48] Ishikawa K., Navab M., Leitinger N., Fogelman A. M., Lusis A. J.: Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J. Clin. Invest.* 1997, 100: 1209-1216.
- [49] Ishikawa K., Sugawara D., Wang X. P., Suzuki K., Itabe H., Maruyama Y., Lusis A. J.: Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in LDL-receptor knockout mice. *Circ. Res.* 2001, 88: 506-512.
- [50] Ishikawa K., Sugawara D., Goto J., Watanabe Y., Kawamura K., Shiomi M., Itabe H., Maruyama Y.: Heme oxygenase-1 inhibits atherogenesis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 2001, 104: 1831-1836.
- [51] Ishizaka N., de Leon H., Laursen J. B., Fukui T., Wilcox J. N., De Keulenaer G., Griendling K. K., Alexander R. W.: Angiotensin II-induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta. *Circulation* 1997, 96: 1923-1929.
- [52] Ishizaka N., Griendling K. K.: Heme oxygenase-1 is regulated by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997, 29: 790-795.
- [53] Ishizaka N., Aizawa T., Ohno M., Usui Si S., Mori I., Tang S. S., Ingelfinger J. R., Kimura S., Nagai R.: Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II. *Hypertension* 2002, 39: 122-128.
- [54] Ishizaka N., Aizawa T., Mori I., Taguchi J., Yazaki Y., Nagai R., Ohno M.: Heme oxygenase-1 is upregulated in the rat heart in response to chronic administration of angiotensin II. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000, 79: H672-H678.
- [55] Johnson R. A., Lavesa M., Askari B., Abraham N. G., Nasjletti A.: A heme oxygenase product, presumably carbon monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. *Hypertension* 1995, 25: 166-169.
- [56] Johnson R. A., Lavesa M., DeSeyn K., Scholer M. J., Nasjletti A.: Heme oxygenase substrate acutely lower blood pressure in hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 1996, 271: H1132-H1138.
- [57] Johnson R. A., Colombari E., Colombari D. S., Lavesa M., Talman W. T., Nasjletti A.: Role of endogenous carbon monoxide in central regulation of arterial pressure. *Hypertension* 1997, 30: 962-967.
- [58] Johnson F. K., Teran F. J., Prieto-Carrasquero M., Johnson R. A.: Vascular effects of a heme oxygenase inhibitor are enhanced in the absence of nitric oxide. *Am. J. Hypertens.* 2002, 15: 1074-1080.
- [59] Johnson F. K., Johnson R. A.: Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003, 285: R536-R541.
- [60] Johnson F. K., Durante W., Peyton K. J., Johnson R. A.: Heme oxygenase inhibitor restores arteriolar nitric oxide function in Dahl rats. *Hypertension* 2003, 41: 149-155.
- [61] Józkwicz A., Huk I., Nigisch A., Weigel G., Dietrich W., Motterlini R., Dulak J.: Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: Stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxid. Redox. Signal.* 2003, 5: 155-162.
- [62] Juan S. H., Lee T. S., Tseng K. W., Liou J. Y., Shyue S. K., Wu K. K., Chau LY.: Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001, 104: 1519-1525.
- [63] Kaide J. I., Zhang F., Wei Y., Jiang H., Yu C., Wang W. H., Balazy M., Abraham N. G., Nasjletti A.: Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J. Clin. Invest.* 2001, 107: 1163-1171.
- [64] Kaneda H., Ohno M., Taguchi J., Togo M., Hashimoto H., Ogasawara K., Aizawa T., Ishizaka N., Nagai R.: Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22: 1680-1685.
- [65] Kaur H., Hughes M. N., Green C. J., Naughton P., Foresti R., Motterlini R.: Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Lett.* 2003, 543: 113-119.
- [66] Kawashima A., Oda Y., Yachie A., Koizumi S., Nakanishi I.: Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum. Pathol.* 2002, 33: 125-130.
- [67] Kharitonov V. G., Sharma V. S., Pilz R. B., Magde D., Koesling D.: Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 2568-2571.
- [68] Kiemer A. K., Bildner N., Weber N. C., Vollmar A. M.: Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells. *Endocrinology* 2003, 144: 802-812.
- [69] Kozma F., Johnson R. A., Zhang F., Yu C., Tong X., Nasjletti A.: Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels. *Am. J. Physiol.* 1999, 276: R1087-R1094.
- [70] Labbe R. F., Vreman H. J., Stevenson D. K.: Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clin. Chem.* 1999, 45: 2060-2072.
- [71] Lakkisto P., Palojoki E., Backlund T., Saraste A., Tikkanen L., Voipio-Pulkki L. M., Pulkki K.: Expression of heme oxygenase-1 in response to myocardial infarction in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002, 34: 1357-1365.
- [72] Leffler C. W., Nasjletti A., Yu C., Johnson R. A., Fedinec A. L., Walker N.: Carbon monoxide and cerebral microvascular tone in newborn pigs. *Am. J. Physiol.* 1999, 276: H1641-H1646.



- [73] Leffler C. W., Balabanova L., Fedinec A. L., Waters C. M., Parfenova H.: Mechanism of glutamate stimulation of CO production in cerebral microvessels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003, 285: H74-H80.
- [74] Levere R. D., Martasek P., Escalante B., Schwartzman M. L., Abraham N. G.: Effect of heme arginate administration on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Clin. Invest.* 1990, 86: 213-219.
- [75] Li Volti G., Wang J., Traganos F., Kapps A., Abraham N. G.: Differential effect of heme oxygenase-1 in endothelial and smooth muscle cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 296: 1077-1082.
- [76] Liu H., Mount D. B., Nasjletti A., Wang W.: Carbon monoxide stimulates the apical 70-pS K⁺ channel of the rat thick ascending limb. *J. Clin. Invest.* 1999, 103: 963-970.
- [77] Liu H., Song D., Lee S. S.: Role of heme oxygenase-carbon monoxide pathway in pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001, 280: G68-G74.
- [78] Liu X. M., Chapman G. B., Peyton K. J., Schafer A. I., Durante W.: Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 2002, 55: 396-405.
- [79] Liu X. M., Chapman G. B., Wang H., Durante W.: Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2002, 105: 79-84.
- [80] Lo W. C., Jan C. R., Chiang H. T., Tseng C. J.: Modulatory effects of carbon monoxide on baroreflex activation in nucleus tractus solitarii of rats. *Hypertension* 2000, 35: 1253-1257.
- [81] Lo W. C., Chan J. Y., Tung C. S., Tseng C. J.: Carbon monoxide and metabotropic glutamate receptors in rat nucleus tractus solitarii: participation in cardiovascular effect. *Eur. J. Pharmacol.* 2002, 454: 39-45.
- [82] Maines M. D.: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 1988, 2: 2557-2568.
- [83] Maines M. D.: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997, 37: 517-554.
- [84] Mancuso C., Tringali G., Grossman A., Preziosi P., Navarra P.: The generation of nitric oxide and carbon monoxide produces opposite effects on the release of immunoreactive interleukin-1beta from the rat hypothalamus in vitro: evidence for the involvement of different signaling pathways. *Endocrinology* 1998, 139: 1031-1037.
- [85] Masini E., Vannacci A., Marzocca C., Pierpaoli S., Giannini L., Fantappie O., Mazzanti R., Mannaioni P. F.: Heme oxygenase-1 and the ischemia-reperfusion injury in the rat heart. *Ex. Biol. Med. (Maywood)* 2003, 228: 546-549.
- [86] Maulik N., Sharma H. S., Das D. K.: Induction of the haem oxygenase gene expression during the reperfusion of ischemic rat myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996, 28: 1261-1270.
- [87] Mayer M.: Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin. Chem.* 2000, 46: 1723-1727.
- [88] McCoubrey W. K. jr., Huang T. J., Maines M. D.: Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* 1997, 247: 725-732.
- [89] Melo L. G., Agrawal R., Zhang L., Rezvani M., Mangi A. A., Ehsan A., Griese D. P., Dell'Acqua G., Mann M. J., Oyama J., Yet S. F., Layne M. D., Perrella M. A., Dzau V. J.: Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation* 2002, 105: 602-607.
- [90] Morita T., Kourembanas S.: Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J. Clin. Invest.* 1995, 96: 2676-2682.
- [91] Morita T., Perrella M. A., Lee M. E., Kourembanas S.: Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 1475-1479.
- [92] Morita T., Mitsialis S. A., Koike H., Liu Y., Kourembanas S.: Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 32804-32809.
- [93] Motterlini R., Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Mann B. E., Green C. J.: Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ. Res.* 2002, 90: E17-E24.
- [94] Motterlini R., Foresti R., Intaglietta M., Winslow R. M.: NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am. J. Physiol.* 1996, 270: H107-H114.
- [95] Motterlini R., Gonzales A., Foresti R., Clark J. E., Green C. J., Winslow R. M.: Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses *in vivo*. *Circ. Res.* 1998, 83: 568-577.
- [96] Naik J. S., Walker B. R.: Homogeneous segmental profile of carbon monoxide-mediated pulmonary vasodilation in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2001, 281: L1436-L1443.
- [97] Naik J. S., Walker B. R.: Heme oxygenase-mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003, 285: H220-H228.
- [98] Nakayama M., Takahashi K., Komaru T., Fukuchi M., Shioiri H., Sato K., Kitamura T., Shirato K., Yamaguchi T., Suematsu M., Shibahara S.: Increased expression of heme oxygenase-1 and bilirubin accumulation in foam cells of rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21: 1373-1377.
- [99] Ndisang J. F., Wang R.: Age-related alterations in soluble guanylyl cyclase and cGMP pathway in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2003, 21: 1117-1124.
- [100] Ndisang J. F., Wang R.: Alterations in heme oxygenase/carbon monoxide system in pulmonary arteries in hypertension. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2003, 228: 557-563.
- [101] Ndisang J. F., Wu L., Zhao W., Wang R.: Induction of heme oxygenase-1 and stimulation of cGMP production by hemin in aortic tissues from hypertensive rats. *Blood* 2003, 101: 3893-3900.
- [102] Ndisang J. F., Zhao W., Wang R.: Selective regulation of blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension. *Hypertension* 2002, 40: 315-321.
- [103] Neuzil J., Stocker R.: Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 16712-16719.
- [104] Ohru T., Yasuda H., Yamaya M., Matsui T., Sasaki H.: Transient relief of asthma symptoms during jaundice: a possible beneficial role of bilirubin. *Tohoku J. Exp. Med.* 2003, 199: 193-196.
- [105] Ohta K., Yachie A., Fujimoto K., Kaneda H., Wada T., Toma T., Seno A., Kasahara Y., Yokoyama H., Seki H., Koizumi S.: Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency. *Am. J. Kidney Dis.* 2000, 35: 863-870.
- [106] Otterbein L. E., Bach F. H., Alam J., Soares M., Tao Lu H., Wysk M., Davis R. J., Flavell R. A., Choi A. M.: Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 2000, 6: 422-428.
- [107] Otterbein L. E., Zuckerbraun B. S., Haga M., Liu F., Song R., Usheva A., Stachulak C., Bodyak N., Smith R. N., Cszizmadia E., Tyagi S., Akamatsu Y., Flavell R. J., Billiar T. R., Tzeng E., Bach F. H., Choi A. M., Soares M. P.: Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat. Med.* 2003, 9: 183-190.
- [108] Panahian N., Huang T., Maines M. D.: Enhanced neuronal expression of the oxidoreductase biliverdin reductase after permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1999, 50: 1-13.
- [109] Parfenova H., Neff R. A., Alonso J. S., Shlopov B. V., Jamal C. N., Sarkisova S. A., Leffler C. W.: Cerebral vascular endothelial heme oxygenase: expression, localization, and activation by glutamate. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001, 281: C1954-C1963.
- [110] Peyton K. J., Reyna S. V., Chapman G. B., Ensenat D., Liu X. M., Wang H., Schafer A. I., Durante W.: Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth. *Blood* 2002, 99: 4443-4448.
- [111] Poss K. D., Tonegawa S.: Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 10919-10924.
- [112] Poss K. D., Tonegawa S.: Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 10925-10930.
- [113] Pourcyrus M., Bada H. S., Parfenova H., Daley M. L., Korones S. B., Leffler C. W.: Cerebrovasodilatory contribution of endogenous carbon monoxide during seizures in newborn pigs. *Pediatr. Res.* 2002, 51: 579-585.

- [114] Raju V. S., Imai N., Liang C. S.: Chamber-specific regulation of heme oxygenase-1 (heat shock protein 32) in right-sided congestive heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999, 31: 1581-1589.
- [115] Riesco-Fagundo A. M., Perez-Garcia M. T., Gonzalez C., Lopez-Lopez J. R.: O₂ modulates large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels of rat chemoreceptor cells by a membrane-restricted and CO-sensitive mechanism. *Circ. Res.* 2001, 89: 430-436.
- [116] Robinson J. S., Fedinec A. L., Leffler C. W.: Role of carbon monoxide in glutamate receptor-induced dilation of newborn pig portal arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002, 282: H2371-H2376.
- [117] Sabaawy H. E., Zhang F., Nguyen X., ElHosseiny A., Nasjletti A., Schwartzman M., Dennery P., Kappas A., Abraham N. G.: Human heme oxygenase-1 gene transfer lowers blood pressure and promotes growth in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001, 38: 210-215.
- [118] Sacerdoti D., Escalante B., Abraham N. G., McGiff J. C., Levere R. D., Schwartzman M. L.: Treatment with tin prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Science* 1989, 243: 388-390.
- [119] Salim M., Brown-Kipphut B. A., Maines M. D.: Human biliverdin reductase is autophosphorylated, and phosphorylation is required for bilirubin formation. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 10929-10934.
- [120] Sammut I. A., Foresti R., Clark J. E., Exon D. J., Vesely M. J., Sarathchandra P., Green C. J., Motterlini R.: Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of heme oxygenase-1. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 125: 1437-1444.
- [121] Sato K., Balla J., Otterbein L., Smith R. N., Brouard S., Lin Y., Csizmadia E., Sevigny J., Robson S. C., Vercellotti G., Choi A. M., Bach F. H., Soares M. P.: Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J. Immunol.* 2001, 166: 4185-4194.
- [122] Sawle P., Foresti R., Green C. J., Motterlini R.: Homocysteine attenuates endothelial heme oxygenase-1 induction by nitric oxide (NO) and hypoxia. *FEBS Lett.* 2001, 508: 403-406.
- [123] Schillinger M., Exner M., Mlekusch W., Ahmadi R., Rumpold H., Mannhalter C., Wagner O., Minar E.: Heme oxygenase-1 genotype is a vascular anti-inflammatory factor following balloon angioplasty. *J. Endovasc. Ther.* 2002, 9: 385-394.
- [124] Schillinger M., Exner M., Mlekusch W., Domanovits H., Huber K., Mannhalter C., Wagner O., Minar E.: Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm. *Thromb. Res.* 2002, 106: 131-136.
- [125] Seki T., Naruse M., Naruse K., Yoshimoto T., Tanabe A., Tsuchiya K., Hirose S., Imaki T., Nihei H., Demura H.: Roles of heme oxygenase/carbon monoxide system in genetically hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 241: 574-578.
- [126] Seki T., Naruse M., Naruse K., Yoshimoto T., Tanabe A., Seki M., Tago K., Imaki T., Demura H., Demura H.: Induction of heme oxygenase produces load-independent cardioprotective effects in hypertensive rats. *Life Sci.* 1999, 65: 1077-1086.
- [127] Sharma H. S., Maulik N., Ghosh B. C., Das D. K., Verdouw P. D.: Coordinated expression of heme oxygenase-1 and ubiquitin in the porcine heart subjected to ischemia and reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.* 1996, 157: 111-116.
- [128] Silva C. C., Almeida V. A., Haibara A. S., Johnson R. A., Colombari E.: Role of carbon monoxide in L-glutamate-induced cardiovascular responses in nucleus tractus solitarius of conscious rats. *Brain Res.* 1999, 824: 147-152.
- [129] Soares M. P., Lin Y., Anrather J., Csizmadia E., Takigami K., Sato K., Grey S. T., Colvin R. B., Choi A. M., Poss K. D., Bach F. H.: Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat. Med.* 1998, 4: 1073-1077.
- [130] Song R., Mahidhara R. S., Liu F., Ning W., Otterbein L. E., Choi A. M.: Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2002, 27: 603-610.
- [131] Stocker R., Glazer A. N., Ames B. N.: Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84: 5918-5922.
- [132] Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A. F., Glazer A. N., Ames B. N.: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987, 235: 1043-1046.
- [133] Suematsu M., Goda N., Sano T., Kashiwagi S., Egawa T., Shinoda Y., Ishimura Y.: Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* 1995, 96: 2431-2437.
- [134] Suematsu M., Wakabayashi Y., Ishimura Y.: Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc. Res.* 1996, 32: 679-686.
- [135] Suttner D. M., Dennery P. A.: Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.* 1999, 13: 1800-1809.
- [136] Suzuki M., Isoo N., Takeshita S., Tsukamoto K., Mori I., Sato T., Ohno M., Nagai R., Ishizaka N.: Facilitated angiogenesis induced by heme oxygenase-1 gene transfer in a rat model of hindlimb ischemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 302: 138-143.
- [137] Thom S. R., Fisher D., Xu Y. A., Notarfrancesco K., Ischiropoulos H.: Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97: 1305-1310.
- [138] Thorup C., Jones C. L., Gross S. S., Moore L. C., Goligorsky M. S.: Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am. J. Physiol.* 1999, 277: F882-F889.
- [139] Togane Y., Morita T., Suematsu M., Ishimura Y., Yamazaki J. I., Katayama S.: Protective roles of endogenous carbon monoxide in neointimal development elicited by arterial injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000, 278: H623-H632.
- [140] Tschugguel W., Stonek F., Zhegu Z., Dietrich W., Schneeberger C., Stimpfl T., Waldhoer T., Vycudilik W., Huber J. C.: Estrogen increases endothelial carbon monoxide, heme oxygenase 2, and carbon monoxide-derived cGMP by a receptor-mediated system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001, 86: 3833-3839.
- [141] Tsui T. Y., Wu X., Lau C. K., Ho D. W., Xu T., Siu Y. T., Fan S. T.: Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer. *Circulation* 2003, 107: 2623-2629.
- [142] Tulis D. A., Durante W., Peyton K. J., Chapman G. B., Evans A. J., Schafer A. I.: YC-1, a benzyl indazole derivative, stimulates vascular cGMP and inhibits neointima formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 279: 646-652.
- [143] Tulis D. A., Durante W., Peyton K. J., Evans A. J., Schafer A. I.: Heme oxygenase-1 attenuates vascular remodeling following balloon injury in rat carotid arteries. *Atherosclerosis* 2001, 155: 113-122.
- [144] Tulis D. A., Durante W., Liu X., Evans A. J., Peyton K. J., Schafer A. I.: Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene delivery inhibits injury-induced vascular neointima formation. *Circulation* 2001, 104: 2710-2715.
- [145] Tulis D. A., Bohl Masters K. S., Lipke E. A., Schiesser R. L., Evans A. J., Peyton K. J., Durante W., West J. L., Schafer A. I.: YC-1-mediated vascular protection through inhibition of smooth muscle cell proliferation and platelet function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 291: 1014-1021.
- [146] Ushiyama M., Morita T., Katayama S.: Carbon monoxide regulates blood pressure cooperatively with nitric oxide in hypertensive rats. *Heart Vessels* 2002, 16: 189-195.
- [147] Vitek L., Jirsa M., Brodanova M., Kalab M., Marecek Z., Danzig V., Novotny L., Kotal P.: Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002, 160: 449-456.
- [148] Vulapalli S. R., Chen Z., Chua B. H., Wang T., Liang C. S.: Cardioselective overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002, 283: H688-H694.
- [149] Wagener F. A., da Silva J. L., Farley T., de Witte T., Kappas A., Abraham N. G.: Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J. Pharmacol. Ex. Ther.* 1999, 291: 416-423.
- [150] Wagner C. T., Durante W., Christodoulides N., Hellums J. D., Schafer A. I.: Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1997, 100: 589-596.

- [151] Wang R., Wu L. 1997: The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272: 8222-8226.
- [152] Wang R., Wang Z., Wu L.: Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 1997, 121: 927-934.
- [153] Wang R., Wu L., Wang Z.: The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 1997, 434: 285-291.
- [154] Wang R. 1998: Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76: 1-15.
- [155] Wang L. J., Lee T. S., Lee F. Y., Pai R. C., Chau L. Y.: Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* 1998, 152: 711-720.
- [156] Wang R., Wang Z., Wu L., Hanna S. T., Peterson-Wakeman R.: Reduced vasorelaxant effect of carbon monoxide in diabetes and the underlying mechanisms. *Diabetes* 50: 2001, 166-174.
- [157] Wang R., Wu L.: Interaction of selective amino acid residues of K(ca) channels with carbon monoxide. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2003, 228: 474-480.
- [158] Wiesel P., Patel A. P., Carvajal I. M., Wang Z. Y., Pellacani A., Maemura K., DiFonzo N., Rennke H. G., Layne M. D., Yet S. F., Lee M. E., Perrella M. A.: Exacerbation of chronic renovascular hypertension and acute renal failure in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circ. Res.* 2001, 88: 1088-1094.
- [159] Wu L., Cao K., Lu Y., Wang R.: Different mechanisms underlying the stimulation of K(Ca) channels by nitric oxide and carbon monoxide. *J. Clin. Invest.* 2002, 110: 691-700.
- [160] Yachie A., Niida Y., Wada T., Igarashi N., Kaneda H., Toma T., Ohta K., Kasahara Y., Koizumi S.: Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 1999, 103: 129-135.
- [161] Yet S. F., Perrella M. A., Layne M. D., Hsieh C. M., Maemura K., Kobzik L., Wiesel P., Christou H., Kourembanas S., Lee M. E.: Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J. Clin. Invest.* 1999, 103: R23-R29.
- [162] Yet S. F., Tian R., Layne M. D., Wang Z. Y., Maemura K., Solovyeva M., Ith B., Melo L. G., Zhang L., Ingwall J. S., Dzau V. J., Lee M. E., Perrella M. A.: Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ. Res.* 2001, 89: 168-173.
- [163] Yoshida T., Maulik N., Ho Y. S., Alam J., Das D. K.: H_{max-1} constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: A study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the Heme oxygenase-1 gene. *Circulation* 2001, 103: 1695-1701.
- [164] Zakhary R., Gaine S. P., Dinerman J. L., Ruat M., Flavahan N. A., Snyder S. H.: Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93: 795-798.
- [165] Zakhary R., Poss K. D., Jaffrey S. R., Ferris C. D., Tonegawa S., Snyder S. H.: Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 14848-14853.
- [166] Zhang F., Kaide J., Wei Y., Jiang H., Yu C., Balazy M., Abraham N. G., Wang W., Nasjletti A.: Carbon monoxide produced by isolated arterioles attenuates pressure-induced vasoconstriction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001, 281: H350-H358

