

Received: 2006.10.23
Accepted: 2007.02.27
Published: 2007.03.28

Znaczenie metabolizmu argininy w astmie oskrzelowej

Arginine Metabolism in Bronchial Asthma

Anna M. Lewandowicz, Rafał Pawliczak

Zakład Immunopatologii Katedry Immunologii, Wydział Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Patogeneza astmy oskrzelowej wiąże się z przewlekłym zapaleniem w drogach oddechowych, w którym uczestniczy wiele komórek i uwalnianych przez nie substancji. W jego przebiegu dochodzi do wzmożonej ekspresji indukowanej syntazy tlenku azotu, czego następstwem jest zwiększone stężenie tego gazu w wydychanym powietrzu. Ocena stężenia tlenku azotu w powietrzu wydychanym jest nieinwazyjną metodą pomiaru nasilenia zapalenia toczącego się w drogach oddechowych. Badanie to znalazło zastosowanie w diagnozowaniu i monitorowaniu leczenia astmy. Złożona rola tlenku azotu w astmie nie została do końca poznana i pozostaje niejasna. Oprócz jego zwiększonego wytwarzania przez indukowaną syntazę tlenku azotu dochodzi do upośledzenia funkcji neuronalnej i śródbłonkowej izoformy syntazy. Wydaje się to spowodowane zmianami w metabolizmie aminokwasu argininy w astmie. Arginina jest substratem zarówno do syntazy tlenku azotu jak i arginazy. Ekspresja arginazy w astmie ulega zwiększeniu pod wpływem prozapalnych cytokin, przede wszystkim IL-4 i IL-13. Arginaza wpływa na aktywność syntazy tlenku azotu konkurując z nią o substrat oraz przyczynia się do zmian strukturalnych w drogach oddechowych w przebiegu astmy. Enzym ten przekształca L-argininę do L-ornityny – prekursora poliamin (putrescyny, spermidyny, sperminy) biorących udział w kontroli proliferacji komórek, oraz proliny – aminokwasu podstawowego w wytwarzaniu kolagenu. Praca ta ujmuje zagadnienie zaburzeń metabolizmu argininy w astmie uwzględniając – obok podkreślanego w wielu publikacjach znaczenia syntazy tlenku azotu – także najnowsze doniesienia o wpływie arginazy na objawy i przebieg choroby.

Słowa kluczowe:

astma • arginina • tlenek azotu • syntaza tlenku azotu • arginaza

Summary

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways in which many cells and cellular elements play a role. Airway inflammation is associated with an enhanced expression of inducible nitric oxide synthase. This increases nitric oxide production and results in higher levels of NO• gas in exhaled air. Measurement of exhaled nitric oxide is a very useful non-invasive method in the diagnosis and treatment monitoring of asthma. However, the role of nitric oxide in asthma, still under intense debate, should not be regarded only as a consequence of its abundance, but rather as an impairment of the mechanisms that regulate its synthesis and activity, including reducing nitric oxide production by neuronal and endothelial synthase. Arginine is a substrate for both nitric oxide synthase and arginase. Arginase expression in the lung is strongly induced by cytokines, in particular IL-4 and IL-13, which are produced at elevated level in asthmatic airways and which activate inflammatory pathways. Arginase modulates nitric oxide synthase activity and provides a precursor for polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) and proline, which stimulate cell growth and collagen synthesis, respectively. Therefore, arginase might also be involved in inflammation-induced airway remodeling in chronic asthma. This review presents arginine homeostasis in asthma and focuses not only on inducible nitric oxide synthase, but also



on impairment of constitutive nitric oxide synthase activity and the overproduction of arginase downstream products.

Key words: asthma • arginine • nitric oxide • nitric oxide synthase • arginase

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10281.pdf

Word count: 4476

Tables: 2

Figures: 4

References: 96

Adres autora: dr hab. med. Rafał Pawliczak, Zakład Immunopatologii Katedry Immunologii, Wydział Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Pomorska 251, budynek C5, pokój 46, 92-215 Łódź; e-mail: rafal.pawliczak@csk.umed.lodz.pl

ASTMA OSKRZELOWA

Światowa Inicjatywa Zwalczenia Astmy (Global Initiative for Astma – GINA) definiuje astmę jako przewlekłą chorobę zapalną dróg oddechowych, klinicznie objawiającą się nadreaktywnością oskrzeli z ich obturacją o zmiennym nasileniu ustępującą samoistnie lub pod wpływem leczenia. Nadreaktywność oskrzeli w astmie prowadzi do nawracających epizodów świszczącego oddechu i kaszlu, występujących najczęściej w nocy lub nad ranem [56].

Zapalenie oskrzeli w astmie, obecne także w bezobjawowym okresie choroby, charakteryzuje zwiększenie liczby pobudzonych eozynofiliów, mastocytów, makrofagów i limfocytów T w błonie śluzowej i świetle oskrzeli. Komórki te wydzielają liczne substancje powodujące skurcz mięśni gładkich, zwiększone wydzielanie śluzu i wzmożoną przepuszczalność naczyń krwionośnych prowadzącą do obrzęku błony śluzowej [81]. Zjawiska te leżą u podłoża odwracalnej obturacji oskrzeli w astmie. Nasilenie procesu zapalnego w drogach oddechowych przesądza o ciężkości astmy. Wyraźnie koreluje ono z nadreaktywnością oskrzeli, czyli ich nadmierną reakcją skurczową na różne bodźce obojętne dla osób zdrowych, m.in. alergenów wziewne, wysiłek fizyczny, zimne powietrze czy silne reakcje emocjonalne [58]. Wraz z postępem choroby pojawiają się zmiany strukturalne określane jako przebudowa (remodeling) oskrzeli, prowadzące do nieodwracalnego upośledzenia funkcji wentylacyjnej płuc. Zaliczamy do nich: pogrubienie błony podstawnej związane z podnabłonkowym odkładaniem się włókien kolagenowych, przerost i rozrost komórek mięśniowych gładkich, zwiększenie liczby komórek kubkowych i gruczołów podśluzowych oraz tworzenie nowych naczyń [9]. Zapalenie oraz przebudowa dróg oddechowych są odpowiedzialne zarówno za nawracające zaostrzenia astmy, jak i przewlekłe zaburzenia przepływu powietrza przez drogi oddechowe.

Astma często towarzyszy atopii, która wiąże się z wytwarzaniem nadmiernej ilości przeciwciał klas IgE w odpowiedzi na pospolite antygeny środowiskowe. Atopia stanowi najsilniejszy czynnik ryzyka rozwoju astmy [62]. Zależne od IgE przewlekłe zapalenie alergiczne w astmie jest realizowane przez odpowiedź immunologiczną związaną z subpopulacją limfocytów pomocniczych typu Th2. Komórki te są źród-

łem cytokin aktywujących eozynofile, nasilających rozrost komórek tucznych oraz wytwarzanie immunoglobulin klasy IgE (IL-4, -5, -9, -13) [15]. Przesunięcie równowagi odpowiedzi immunologicznej w kierunku typu Th2 w astmie i alergii może być związane z coraz rzadszym występowaniem infekcji stymulujących układ odpornościowy w kierunku odpowiedzi typu Th1. Hipoteza higieniczna wskazuje na poprawę warunków sanitarno-epidemiologicznych jako czynnik, który uwarunkował wzrost zapadalności na astmę odnotowany w ostatnim ćwierćwieczu [78]. Kontakt układu odpornościowego z patogenami, takimi jak wirus zapalenia wątroby typu A, bakteria *Helicobacter pylori* [34] oraz *Mycobacterium tuberculosis* [86] zmniejsza ryzyko zachorowania na astmę atopową.

Chorzy na astmę niealergiczną tzw. wewnątrzpochodną nie wykazują cech atopii. Komórki z ekspresją receptora o dużym powinowactwie do IgE (FcεRI) oraz cytokiny typu Th₂ obecne są w bioptatach zapalnie zmienionej błony śluzowej oskrzeli także w astmie bez atopii [29]. Przemawia to za podłożem immunologicznym astmy niealergicznej, choć mechanizmy prowadzące do przewlekłego zapalenia dróg oddechowych są w jej przypadku słabo poznane.

Metody stosowane w diagnostyce i monitorowaniu leczenia przeciwzapalnego w astmie muszą być proste i nieinwazyjne (tabela 1). Analiza skrawków tkankowych i płuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (bronchoalveolar lavage – BAL) pozyskiwanych w bronchofiberoskopii jest metodą inwazyjną, niezastąpioną w badaniach nad patogeną astmy, ale mało przydatną w praktyce klinicznej. Metody z wykorzystaniem pomiarów spirometrycznych (próby rozkurczowe, próby prowokacyjne, ocena dobowej zmienności szczytowego przepływu wydechowego) wskazują na zaburzenie funkcji oddechowych będących następstwem zapalenia przewlekłe toczącego się w oskrzelach. Jedynie pośrednio mówią o jego obecności i nasileniu. Charakteryzuje je mała czułość w bezobjawowym okresie choroby i konieczność współpracy z pacjentem, stąd pozostają trudne do wykonania w niektórych przypadkach np. u małych dzieci. Coraz szersze zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu leczenia astmy znajdują nieinwazyjne metody oparte na badaniu indukowanej płwociny, kondensatu oddechowego oraz na pomiarze stężenia tlenu azotu w powietrzu wydychanym [88]. U chorych

Tabela 1. Metody stosowane do oceny zapalenia w astmie

Metody inwazyjne oparte na bronchofiberoskopii	Metody z wykorzystaniem pomiarów spirometrycznych	Badanie indukowanej płwociny	Badanie kondensatu oddechowego	Badanie składu powietrza wydychanego
Pobieranie biopłatów oskrzeli do badania patomorfologicznego i immunohistochemicznego	monitorowanie dobowej zmienności szczytowego przepływu wydechowego (PEF)	analiza liczby eozynofili w pozyskanych materiale	ocena ilości 8-izoprostanów i innych metabolitów kwasu arachidonowego w pozyskanych materiale	pomiar stężenia tlenu azotu w powietrzu wydychanym
Płukanie drobnych dróg oddechowych i pęcherzyków płucnych 0,9% NaCl z uzyskaniem popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych do badania cytologicznego i biochemicznego	badanie odwracalności obturacji oskrzeli z wykorzystaniem pomiaru pierwszosekundowej wydechowej objętości minutowej (FEV1)			pomiar stężenia tlenu węgla w powietrzu wydychanym
	testy prowokacyjne – swoiste – nieswoiste			

na astmę wzrasta liczba eozynofili oraz stężenie białka kationowego eozynofili (eosinophil cationic protein – ECP) w indukowanej płwocinie, co koreluje ze stopniem ciężkości przebiegu choroby [22]. W kondensacie powietrza pochodzącym od chorych na astmę obserwuje się wzrost stężenia 8-izoprostanu, powstającego w wyniku nieenzymatycznej peroksydacji kwasu arachidonowego [93]. Wzrost stężenia tlenu węgla w powietrzu wydychanym jest markerem stresu oksydacyjnego w przebiegu zapalenia toczonego się w oskrzelach [60].

Pomiar stężenia tlenu azotu w powietrzu wydychanym jest metodą bezpieczną, niepowodującą nasilenia objawów oraz charakteryzującą się wysoką czułością (67,2–92,7%) i zadowalającą swoistością (76,0–96,3%) w rozpoznawaniu astmy. Ma to szczególnie duże znaczenie u pacjentów z prawidłowymi lub zbliżonymi do prawidłowych wynikami pomiarów spirometrycznych [5]. U chorych na astmę dochodzi do wzrostu ekspresji indukowanej postaci syntazy tlenu azotu, czego następstwem jest wzrost stężenia NO• w wydychanym powietrzu, korelujący ze zwiększeniem liczby eozynofili w objętej procesem zapalnym błonie śluzowej oskrzeli i ulegający znacznemu obniżeniu pod wpływem leczenia przeciwzapalnego. Badanie to pozwala m.in. na diagnostykę astmy przed włączeniem leczenia przeciwzapalnego oraz optymalne dobranie dawki glikokortykosteroidów, a tym samym redukcję działań niepożądanych związanych z przewlekłym stosowaniem tych leków przy zachowaniu dobrej kontroli astmy [71].

Mimo iż tlenek azotu znalazł zastosowanie w praktyce klinicznej w diagnozowaniu i monitorowaniu leczenia astmy, jego rola w tej chorobie nie została do końca wyjaśniona i jednoznacznie zinterpretowana. Znaczenie tlenu azotu w astmie nie sprowadza się jedynie do jego nadmiernego wytwarzania, lecz wiąże się także z zaburzeniem mechanizmów regulujących jego powstawanie i działanie.

W drogach oddechowych w astmie dochodzi do zaburzeń metabolizmu aminokwasu argininy, z którego powstaje tlenek azotu. Składa się na nie upośledzony transport argininy do komórek, zwiększona ekspresja arginazy oraz wspom-

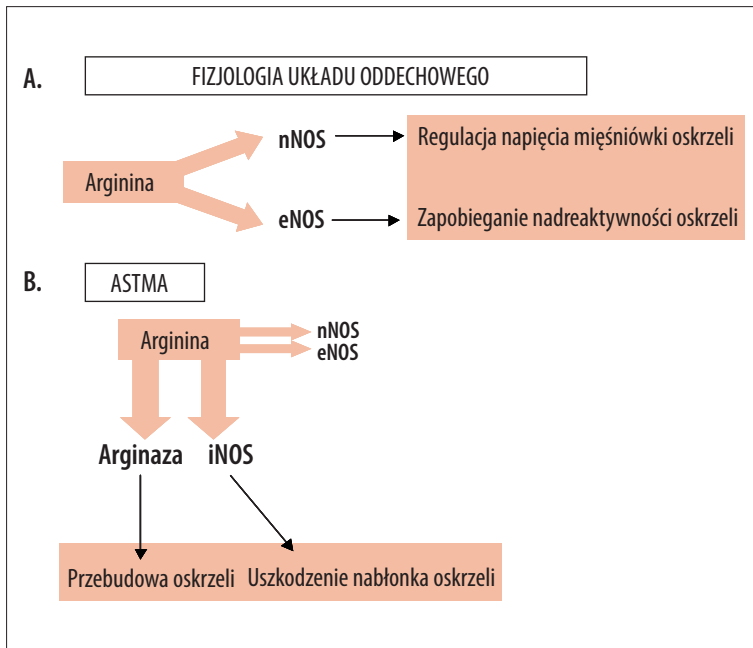
nianej wcześniej indukowanej izoformy syntazy tlenu azotu. Następstwem tego jest upośledzenie wytwarzania tlenu azotu przez konstytutywne izoformy jego syntazy – neuronalną i śródbłonkową. Tlenek azotu wytwarzany przez te dwa enzymy prawdopodobnie chroni drogi oddechowe zapobiegając ich nadreaktywności i stąd jego niedobór w astmie jest zjawiskiem bardzo niekorzystnym. Tlenek azotu wykrywany w powietrzu wydychanym u osób chorych na astmę, pochodzący z indukowanej izoformy syntazy, koreluje z nasileniem zapalenia i za pośrednictwem różnych mechanizmów uszkadza drogi oddechowe nasilając objawy choroby. Metabolity argininy powstające na szlaku arginazy przyczyniają się do nieodwracalnych zmian strukturalnych oskrzeli, do jakich dochodzi w przebiegu astmy [52] (ryc. 1).

ARGININA

L-arginina (kwas 2-amino-5-guanidynowalerianowy) jest aminokwasem kationowym wymagającym nośników białkowych w swojej drodze przez błonę komórkową. Transport argininy do komórki jest realizowany z udziałem złożonych układów białek nośnikowych, głównie za pośrednictwem układu białek nośnikowych y⁺. System y⁺ tworzy rodzina białek przENOśnikowych CAT (CAT – cationic aminoacid transporter): CAT-1, CAT-2, CAT-3. Gen kodujący białko CAT-1 ulega ekspresji w większości tkanek organizmu. Białko CAT-2 ma dwie izoformy: CAT-2A i CAT-2B charakteryzujące się swoistością tkankową. CAT-2A ulega silnej ekspresji w hepatocytach. CAT-2B ulega indukowanej ekspresji tylko w niektórych typach komórek np. makrofagach, astrocytach, limfocytach czy komórkach mięśni gładkich naczyń. Ekspresja CAT3 ogranicza się do mózgu. Wszystkie cztery białka (CAT-1, dwie izoformy CAT-2 i CAT-3) ułatwiają – niezależny od jonów Na⁺ – transport argininy, lizyny i ornityny [74].

W organizmie ludzkim arginina jest substratem do syntazy tlenu azotu, arginazy, amidynotransferazy arginoglicynowej oraz dekarboksylazy argininy. Katabolizm argininy jest źródłem tlenu azotu, mocznika, ornityny, cytruliny, glutaminianu i glutaminy, agmatyny, proliny i poliamin [53].





Ryc. 1. Zaburzenia metabolizmu arginy w astmie. Arginina jest substratem dla syntaz tlenku azotu i arginazy. Arginina w fizjologii układu oddechowego wykorzystywana jest przez neuronalną (nNOS) oraz śródbłonkową (eNOS) izoformę syntazy tlenku azotu do wytwarzania NO[•]. Powstający tlenek azotu reguluje podstawowe napięcie mięśniówki gładkiej naczyń i oskrzeli oraz zapobiega nadreaktywności tych ostatnich (A). W warunkach przewlekłego zapalenia oskrzeli dochodzi do wzmożonej ekspresji indukowanej izoformy syntazy tlenku azotu oraz arginazy. Powoduje to niedobór substratu nNOS i eNOS i niewystarczające wytwarzanie przez te enzymy tlenku azotu o właściwościach bronchoprotekcyjnych (B)

TLENEK AZOTU

Mechanizmy działania NO[•] w układach biologicznych

Tlenek azotu powiązany z fizjologią i patofizjologią zjawisk zachodzących w ludzkim organizmie dopiero w latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia. Wcześniej postrzegano go przede wszystkim jako gaz obecny w dymie tytoniowym i spalinach samochodowych, zanieczyszczający powietrze, przyczyniający się do powstawania smogu i kwaśnych deszczy. Tymczasem czasopismo *Science* uznało tlenek azotu cząsteczką 1992 roku, a sześć lat później trójce uczonych przyznano Nagrodę Nobla z Fizjologii i Medycyny za wyjaśnienie roli NO w układzie krążenia.

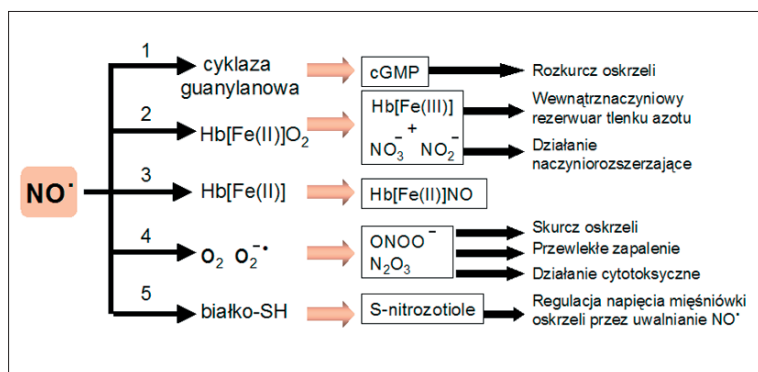
W 1980 roku Robert Furchgott wykazując, że rozkurczowe działanie acetylocholino ujawnia się tylko wtedy, gdy ściana naczynia pokryta jest od wewnątrz śródbłonkiem, zasugerował wytwarzanie przez komórki śródbłonka niezidentyfikowanej substancji nazwanej opisowo: *czynnikiem rozkurczającym pochodzącym ze śródbłonka* (EDRF – endothelium-derived relaxing factor) [20]. Drugi z laureatów, Ferid Murad, udowodnił, że zwiększenie przepływu krwi przez naczynia wieńcowe po zażyciu nitrogliceryny jest spowodowane uwolnieniem z jej struktury cząsteczki tlenku azotu i następującą aktywacją przez niego cyklicznej guanylanowej [55]. Trzeci noblista – Louis Ignarro – ustalił, że EDRF to tlenek azotu [30]. Kolejnym krokiem było wskazanie funkcji tego związku poza układem sercowo-naczyniowym. Okazało się, że oprócz regulacji ciśnienia tętniczego krwi NO[•] wpływa na agregację trombocytów [85], jest neuroprzekaznikiem zarówno w centralnym, jak i w obwodowym układzie nerwowym [7], a także mediatorem uczestniczącym w realizacji odpowiedzi immunologicznej [8].

Działanie tlenku azotu za pośrednictwem cyklicznej guanylanowej jest najlepiej poznanym mechanizmem wpływu tego związku na układy biologiczne. NO[•] wiąże się z grupą he-

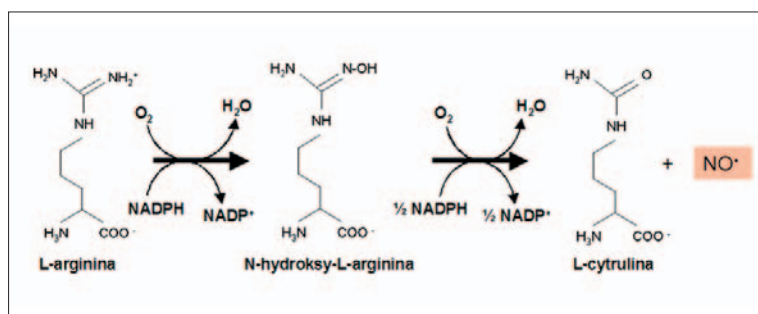
mowa cyklicznej guanylanowej doprowadzając do zmian konformacyjnych w obrębie cząsteczki tego enzymu. W wyniku tej interakcji z guanozynomonofosforanem (GMP) powstaje cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP), który z kolei aktywuje kinazę białkową zależną od cGMP. Uruchamia ona dalsze przekazywanie sygnału doprowadzając do zmniejszenia stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego i obniżenia wrażliwości na wapń włókienek kurczliwych miocytu [44]. Zależne od cyklicznej guanylanowej działanie NO[•] wiąże się z rozkurczem błony mięśniowej naczyń i oskrzeli. Oprócz cyklicznej guanylanowej tlenek azotu może reagować z innymi enzymami zawierającymi ugrupowanie hemowe, takimi jak oksydaza cytochromowa c [77] lipoksygenaza [58], syntaza prostaglandyny H [57], mieloperoksydaza [3].

Tlenek azotu jest cząsteczką bardzo nietrwałą. Dostając się do krążenia dyfunduje do erytrocytów, gdzie wiąże się z hemoglobiną odtlenowaną Hb[Fe(II)] tworząc kompleks Hb[Fe(II)]NO oraz wchodzi w reakcje z ugrupowaniem hemowym oksyhemoglobiny Hb[Fe(II)]O₂ modyfikując ją do methemoglobiny Hb[Fe(III)] z wytworzeniem azotanu NO₃⁻ i azotynu NO₂⁻ [13]. Azotyn jako związek relatywnie stabilny stanowi wewnątrznaczyniowy rezerwuuar tlenku azotu w układzie krążenia. NO₂⁻ wykazuje działanie naczyniorozszerzające w warunkach niedotlenienia przez uwalnianie NO[•] w reakcji z hemoglobiną odtlenowaną i innymi odtlenowanymi białkami hemowymi np. mioglobina [12].

NO[•] reagując z tlenem cząsteczkowym O₂ oraz anionorodnikiem ponadtlenkowym O₂⁻ tworzy bardzo reaktywne związki azotu, takie jak trójtlenek dwuazotu N₂O₃ i nadtlenoazotyn (ONOO⁻) [89], poprzez które wpływa na wiele procesów i zjawisk w układach biologicznych. Nadtlenoazotyn jest związkiem cytotoksycznym uszkadzającym strukturę komórki na wiele sposobów. ONOO⁻ powoduje nitrację reszt tyrozynowych białek, co może upośledzać ich fosforylację przez kinazy [47], bądź zwiększać ich podatność na degradację w proteosomach [72].



Ryc. 2. Mechanizmy działania tlenu azotu; 1 – tlenek azotu aktywuje cyklozę guanylanową przekształcającą GTP w cGMP, 2 – tlenek azotu reaguje z grupą hemową hemoglobiny utlenowanej utleniając jej cząsteczkę do methemoglobiny a sam przekształca się w azotan lub azotyn, 3 – tlenek azotu z hemoglobina odtlenowaną tworzy związek kompleksowy, 4 – tlenek azotu reaguje z tlenem cząsteczkowym i anionorodnikiem ponadtlenkowym tworzy reaktywne związki azotu, 5 – tlenek azotu przyłącza się do grup sulfhydrylowych tworząc S-nitrozotiole



Ryc. 3. Reakcja katalizowana przez syntazę tlenu azotu. Substratem w reakcji jest L-arginina, której przekształcenie do L-cytruliny z wytworzeniem tlenu azotu przebiega dwuetapowo z wytworzeniem produktu pośredniego N^ω-hydroksy-L-argininy. Jest to reakcja pięcioelektronowego utleniania

Związek ten inicjuje także peroksydację lipidów i fragmentację DNA [11,69].

Białka zawierające grupy sulfhydrylowe w swojej cząsteczce, w reakcji z N₂O₃ lub ONOO⁻ tworzą S-nitrozotiole [18,79]. Są to dość stabilne związki, zdolne do ponownego uwalniania NO•. Białka zawierające S-nitrozowane grupy tiolowe działają wazodylatoryjnie. Także hemoglobina może ulec nitrozylacji z wytworzeniem nitrozoooksyhemoglobiny SNO-Hb[Fe(III)]O₂. Jon nitrozonowy (NO⁺) może być przekazywany grupom –SH kolejnych białek [49]. S-nitrozylację, analogicznie do fosforylacji, można traktować jako potranslacyjną modyfikację białek, zmienia ona ich strukturę przestrzenną wpływając często na funkcje jakie pełnią w komórkach. Odnosi się to do białek strukturalnych, sygnałowych, enzymów, czynników transkrypcyjnych, a także kanałów jonowych [10].

Wymienione i opisane w tym podrozdziale interakcje tlenu azotu z biomolekułami i związkami chemicznymi w układach biologicznych zostały przedstawione na rycinie 2.

Izoforny syntazy tlenu azotu

Biosynteza NO• odbywa się z udziałem enzymów należących do rodziny syntaz tlenu azotu (NO synthase – NOS). Białka syntaz tlenu azotu są hemoproteinami, które w obecności tlenu cząsteczkowego i tetrahydrobiopteryny (BH₄) katalizują utlenienie grupy guanidowej L-argininy do NO• i L-cytruliny. Reakcja ta przebiega dwuetapowo z powstaniem przejściowego produktu – N^ω-hydroksy-L-argininy [24].

Syntazy NO• w swojej cząsteczce zawiera C-końcową domenę o właściwościach reduktazy przypominającą w budowie reduktazę cytochromu P-450 oraz N-końcową domenę oksygenazową. Obie te domeny łączy łańcuch peptydowy wiążący

kalmodulinę (CaM). Reduktaza jest wyposażona w miejsca wiązania dinukleotydu flawoadeninowego (FAD), mononukleotydu flawinowego (FMN) oraz fosforanu dinukleotydu nikotynoadeninowego (NADPH), podczas gdy oksygenaza wiąże hem, tetrahydrobiopterynę (BH₄) i L-argininę. Transport elektronów między reduktazą a oksygenazą wykorzystującą je do syntezy tlenu azotu, jest możliwy tylko wtedy, gdy do cząsteczki enzymu przyłączy się kalmodulina [24].

Znane są trzy izoforny NOS: neuronalna syntaza tlenu azotu (neuronal nitric oxide synthase – nNOS, NOS1) indukowana syntaza tlenu azotu (inducible nitric oxide synthase – iNOS, NOS2) oraz śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (endothelial nitric oxide synthase – eNOS, NOS3). Sekwencja aminokwasowa różnych syntaz NO jest zbliżona w 51–57%, ale prawie identyczna w rejonach centrów katalitycznych. nNOS oraz eNOS to izoforny aktywowane wzrostem stężenia wapnia w komórce i związaniem przez ich cząsteczki kalmoduliny. Zarówno nNOS jak i eNOS wytwarzają w przeciągu kilku sekund od zaktywowania tlenek azotu w pikomolowych ilościach. iNOS wykazuje bardzo duże powinowactwo do kalmoduliny już przy niewielkim stężeniu wapnia wewnątrzkomórkowego. Ilość tlenu azotu wytwarzanego przez iNOS jest względnie duża (nanomole), pojawia się w kilka godzin po stymulacji i utrzymuje nawet do kilku dni [2].

Ekspresja nNOS zachodzi przede wszystkim w neuronach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Ulega ona zwiększeniu m.in. w wyniku lokalnego niedokrwienia i hipoksji [19]. Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego jonów Ca²⁺ w związku z otwarciem kanałów wapniowych w błonie komórkowej np. w wyniku depolaryzacji powoduje aktywację enzymu. W drogach oddechowych znaczenie ma ekspresja nNOS w zakończeniach hamujących neuronów nieadrenergicznych i niecholinergiczych – iNANC unerwiających mięśnie gładkie oskrzeli [70].



Tabela 2. Izoformy NOS w drogach oddechowych

Izoforma NOS	Charakter ekspresji	Miejsce ekspresji w układzie oddechowym
eNOS	konstitutywna	<ul style="list-style-type: none"> • komórki śródbłonna • komórki nabłonka wyścielającego drogi oddechowe • komórki nabłonka błony śluzowej nosa
nNOS	konstitutywna	<ul style="list-style-type: none"> • zakończenia włókien hamujących neuronów nieadrenergiczno-niecholinergicznym (iNANC) obecnych w drogach oddechowych od tchawicy do drobnych oskrzeli • komórki nabłonka wyścielającego drogi oddechowe
iNOS	indukowana czynnikami endo- i egzogennymi	<ul style="list-style-type: none"> • makrofagii • komórki nabłonka wyścielającego drogi oddechowe • pneumocyty typ II • komórki tłuszczne • neutrofile • fibroblasty • miocyty gładkie naczyń

Podstawowym, choć nie jedynym, miejscem ekspresji eNOS są komórki śródbłonna naczyniowego. Wzrost ekspresji eNOS jest powodowany działaniem na komórki śródbłonna naczyń sił „ścinających” związanych z przepływem krwi, natomiast zmniejszenie jej ekspresji – hipoksją [19]. W drogach oddechowych ta izoforma syntazy NO• jest obecna, obok komórek śródbłonna naczyniowego, także w komórkach nabłonka oskrzeli i błony śluzowej nosa oraz pneumocytach typu II [70]. Aktywacja eNOS jest następstwem pobudzenia obecnych w błonie komórkowej różnych receptorów, w tym receptorów kinin, substancji P, muskarynowych, purynergicznych i innych, których aktywacja wiąże się z uwolnieniem wapnia z siateczki śródplazmatycznej i wzrostem jego wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺ pobudzenie eNOS do syntezy NO• jest możliwe także za pośrednictwem fosforylacji cząsteczki enzymu [31].

W przeciwieństwie do nNOS i eNOS indukowana syntaza tlenu azotu prawie nie ulega transkrypcji w komórkach spoczynkowych. Jej ekspresja następuje pod wpływem produktów bakteryjnych, np. endotoksyny – lipopolisacharydu (LPS) oraz cytokin: IL-1β, IFN-γ, TNF-α [75]. W indukcję ekspresji enzymu jest zaangażowany czynnik transkrypcyjny NF-κB. Region promotorowy iNOS zawiera wiele miejsc wiązania NF-κB, ale do ekspresji genu konieczna jest aktywacja także innych czynników transkrypcyjnych w tym STAT1α (signal transducer and activator of transcription – STAT) [21]. Ekspresję iNOS hamują glikokortykosteroidy, cytokiny (IL-4, IL-8, IL-10, EGF i FGF, TGF-β) [37]. Regulacja aktywności indukowanej syntazy tlenu azotu dokonuje się przede wszystkim na poziomie transkrypcji, ale nie bez znaczenia jest dla niej stabilność transkryptu, potranslacyjna modyfikacja białka oraz dostępność substratów i kofaktorów katalizowanej reakcji [1]. Tlenek azotu zmniejsza aktywność NOS w komórce na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego bezpośrednio wpływając na cząsteczkę enzymu, translację, stabilność mRNA i proces transkrypcji oraz pobudzając wytwarzanie cytokin, takich jak IL-8 i TGF-β. TGF-β moduluje ekspresję iNOS destabilizując mRNA i zmniejszając efektywność procesu translacji [83]. W drogach oddechowych w przebiegu astmy iNOS pojawia się przede

wszystkim w komórkach nabłonka oskrzeli i nacieku zapalnego – makrofagach, eozynofilach i neutrofilach, a także w komórkach śródbłonna, pneumocytach typu II, fibroblastach i miocytach [6,70].

Syntazy NO• oprócz syntezy tlenu azotu, mają także zdolność wytwarzania anionu ponadtlenkowego. W odniesieniu do poszczególnych izoform NOS jest to regulowane nieco odmiennymi mechanizmami. Zmniejszona dostępność L-argininy przesądza o wytwarzaniu O₂⁻ przez nNOS i iNOS. Synteza O₂⁻ w nNOS odbywa się w obrębie układu hemowego domeny oksigenazowej, natomiast w iNOS zachodzi w okolicy miejsca wiązania nukleotydów flawoa-deninowych na reduktazie. Jednoczesne wytwarzanie tlenu azotu i anionu ponadtlenkowego w obrębie tej samej domeny sprzyja reagowaniu tych związków ze sobą i powstawaniu nadtlenoazotynu. Związek ten wykazując silne działanie cytotoksyczne przesądza o znaczeniu iNOS dla obrony organizmu przed patogenami, ale może też wpływać destrukcyjnie na komórki i tkanki gospodarza w warunkach przewlekłego zapalenia [90].

Następstwem istnienia trzech izoform enzymu odpowiedzialnego za syntezę tlenu azotu podlegających odmiennej regulacji i wykazujących zróżnicowaną ekspresję tkankową jest zróżnicowanie funkcji, jakie NO• pełni w układzie oddechowym. Tlenek azotu wytwarzany przez nNOS i eNOS wywiera korzystne i pożądane działania w drogach oddechowych. W astmie powstaje go za mało, co przyczynia się do dysfunkcji układu oddechowego. Zaburzenie to nie może zostać skompensowane wytwarzaniem NO• przez iNOS. Zwiększone wytwarzanie tlenu azotu przez iNOS w warunkach przewlekłego zapalenia oskrzeli w astmie jest zjawiskiem niepożądanym i koreluje z ciężkością przebiegu choroby.

TLENEK AZOTU W DROGACH ODDECHOWYCH

Rola nNOS i eNOS w fizjologii układu oddechowego

Tlenek azotu pochodzący z nNOS funkcjonuje jako neurotransmitter przekazywania nieadrenergicznego niecholinergicznego (NANC) modulującego napięcie ścian oskrzeli. Hamujące neurony iNANC są umiejscowione w drogach

oddechowych od tchawicy po drobne oskrzela [86]. iN-ANC regulują podstawowe napięcie ścian oskrzeli podczas oddychania [36].

Tlenek azotu reguluje odpowiedź oskrzeli na czynniki wyzwalające ich skurcz (antagoniści receptorów muskarynowych, histamina, bradykinina). Pobudzenie przez te związki właściwych im receptorów wiąże się ze zwiększeniem wapnia wewnątrzkomórkowego, co inicjuje skurcz mięśniówki gładkiej i obturację oskrzeli. Jednocześnie jony Ca^{2+} powodują związanie kalmoduliny przez eNOS obecna w komórkach nabłonka wyściełającego drogi oddechowe. Enzym ten wytwarza $NO\bullet$, który dyfunduje swobodnie do miocytów i inicjuje ich rozkurcz za pośrednictwem aktywacji cykazy guanylowej [70].

Zaburzenia funkcji nNOS i eNOS w astmie

Astmę cechuje nadreaktywność oskrzeli, czyli wzmożona skłonność do obturacji dróg oddechowych w odpowiedzi na czynniki wyzwalające ich skurcz. Nadreaktywność oskrzeli w astmie wiąże się z zaburzeniami wytwarzania $NO\bullet$, co wykazano w badaniach na zwierzętach oraz randomizowanych badaniach klinicznych. Zastosowanie nieselektywnych inhibitorów NOS znacznie wzmacnia odpowiedź dróg oddechowych na metacholinę i bradykininę [66]. Myszy eNOS^{-/-} cechuje nadreaktywność oskrzeli [17].

eNOS znajduje się w błonie podstawnej mikrotubul rzęsek nabłonka migawkowego wyściełającego drogi oddechowe [92]. Zaburzenie wytwarzania tlenu azotu przez eNOS w astmie wiąże się ze zmniejszeniem częstości i nasilenia ruchu migawek, co z kolei powoduje zaleganie śluzu wpływając na sprawność mechanizmów oczyszczania dróg oddechowych z zanieczyszczeń i obrony nieswoistej przed patogenami i stąd przyczynia się do nawracających infekcji dróg oddechowych [34].

Jednym z wykładników przebudowy oskrzeli w astmie jest rozrost mięśniówki gładkiej. Tlenek azotu pochodzący z nNOS ulegającej ekspresji w miocytach hamuje proliferację tych komórek w fazie G1 zależnie od cGMP i w fazie S poprzez inhibicję reduktazy rybonukleotydowej [25,61]. Niedostateczne wytwarzanie tlenu azotu w astmie może więc promować powstawanie nieodwracalnych zmian strukturalnych w drogach oddechowych.

Znaczenie zwiększonego wytwarzania tlenu azotu przez iNOS w patogenezie astmy

Zwiększone stężenie tlenu azotu w wydychanym powietrzu (exhaled NO – eNO) w astmie, które znalazło zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu tej choroby, koreluje z ekspresją iNOS w drogach oddechowych [41]. Zastosowanie selektywnych inhibitorów tego enzymu zmniejszyło o ponad 90% ilość eNO u osób chorych na astmę [27]. Paradoksalnie, zwiększonemu wytwarzaniu tlenu azotu w astmie towarzyszy zmniejszenie ilości S-nitrozotioili. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być rozpad tych związków z uwolnieniem $NO\bullet$ do przestrzeni pęcherzykowej. Wykazano zwiększoną aktywność reduktazy S-nitrosoglutationu – enzymu odpowiedzialnego za ten proces, w zwierzęcym modelu astmy [16]. S-nitrozotiole są obecne w drogach oddechowych osób zdrowych, gdzie

uczestniczą w regulacji napięcia ściany oskrzeli uwalniając tlenek azotu. [59]. Niedobór tych związków w astmie może wpływać na zwiększoną gotowość do skurczu mięśniówki oskrzeli.

iNOS w astmie przyczynia się do nasilenia zapalenia wytwarzając znaczne ilości $NO\bullet$ powodującego zwiększenie przepuszczalności drobnych naczyń, wzmożone wydzielanie śluzu oraz uszkodzenie i złuszczenie się komórek nabłonka wyściełającego oskrzela. Większość tych efektów wiąże się z powstawaniem nadtlenoazotynu ($ONOO^-$) w wyniku reakcji $NO\bullet$ z anionem nadtlenkowym. Potwierdzono to metodami immunohistochemicznymi uwidaczniając obecność reszt 3-nitrotyrozynowych w biopatach z dróg oddechowych chorych na astmę – efekt interakcji nadtlenoazotynu z białkami [65]. Działanie tlenu azotu poprzez formowanie wolnych rodników jest charakterystyczne dla stanu zapalnego. Ma swoje uzasadnienie w roli efektoru odpowiedzi immunologicznej nieswoistej jaką pełni tu tlenek azotu. $NO\bullet$ powstający w wyniku działania iNOS hamuje wzrost komórek nowotworowych i replikację wirusów, wykazuje aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczną a także przeciwpasożytniczą, ale uszkadza surfaktant i upośledza pobieranie tlenu przez pneumocyty typu II [67].

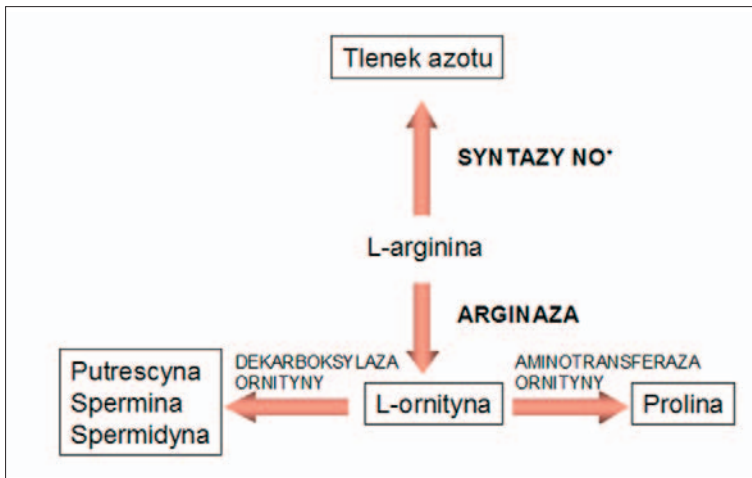
Reaktywne formy tlenu, w tym $O_2^{\cdot-}$ są wytwarzane przez oksydazę NADPH makrofagów oraz peroksydazę granulocytów i makrofagów. Wobec tzw. „wybuchu tlenowego” w zapaleniu, w związku z ich dużą koncentracją, bardzo łatwo dochodzi do powstawania nadtlenoazotynu i innych wolnych rodników azotowych. Szybkie „zmiatanie” tlenu azotu pochodzącego z iNOS ulegającej ekspresji w komórkach fagocytujących (monocytach, makrofagach, eozynofilach i neutrofilach), uniemożliwia tej nietrwałej gazowej cząsteczce podjęcie działań korzystnych z punktu widzenia fizjologii układu oddechowego. Dodatkowo w warunkach niedoboru substratu – L-argininy, indukowana syntaza tlenu azotu sama wytwarza oprócz $NO\bullet$ także $O_2^{\cdot-}$ zwiększając efektywność reakcji prowadzącej do powstania $ONOO^-$ [66].

Dostępność argininy do syntezy tlenu azotu w astmie

Dostępność argininy wpływa na wytwarzanie tlenu azotu przez wszystkie izoformy syntazy, powodując zaburzenie jego działania w astmie. W przypadku eNOS najprawdopodobniej dochodzi do zmniejszenia wytwarzania $NO\bullet$, a w odniesieniu do iNOS – występuje szybki metabolizm $NO\bullet$ do $ONOO^-$. Funkcja nNOS zostaje upośledzona pod wpływem obu tych mechanizmów. U podłoża zmniejszonej dostępności argininy dla NOS leżą dwa zjawiska: zmniejszony transport aminokwasu do komórki oraz konkurencja o substrat z arginazą [98].

Transport argininy do komórek wykorzystujących ten aminokwas do wytwarzania $NO\bullet$ odbywa się z udziałem rodziny białek przenośnikowych CAT układu y^+ [72]. Tymczasem inne białka kationowe, w tym pochodzące z eozynofilów główne białko zasadowe (major basi protein – MBP), hamują układ y^+ [26]. Analog MBP, poli-L-arginina hamując transport argininy do komórek zmniejsza syntezę NO i powoduje nadwrażliwość na metacholinę w wypreparowanej tchawicy świnki morskiej, podobnie jak inhibitor NOS L-NAME (ester metylowy N^o-nitro-L-argininy) [51].





Ryc. 4. Metabolizm argininy w astmie. Arginina jest substratem syntazy tlenu azotu i argininy. Tlenek azotu powstaje z udziałem indukowanej i konstytutywnych izoform syntazy. Produkty metabolizmu argininy na szlaku arginazy to poliaminy i prolina

Arginaza i NOS w reakcjach, które katalizują wykorzystują ten sam substrat L-argininę. Gdy dochodzi do ekspresji w komórce obu tych enzymów jednocześnie, zwiększona aktywność arginazy zmniejsza ilość wewnątrzkomórkowej argininy, którą NOS wykorzystuje do syntezy NO• [50].

ARGINAZA

Izoformy arginazy

Arginaza katalizuje hydrolizę L-argininy do L-ornityny – reakcję związaną z cyklem mocznikowym, który odbywa się przede wszystkim w wątrobie, gdzie znajdują się wszystkie enzymy niezbędne do jego realizacji. W przeciwieństwie do pozostałych enzymów cyklu mocznikowego arginaza występuje również w innych tkankach poza wątrobą, tj. mózgu, nerkach, sercu, jelicie cienkim, płucach, gruczołach sutkowymi. Znane są dwie izoformy arginazy, które katalizują tę samą reakcję, ale różnią się pod względem lokalizacji komórkowej, dystrybucji tkankowej, regulacji ekspresji. Rozróżniamy typ I oraz typ II arginazy [54].

Arginaza I jest enzymem cytosolowym konstytutywnie ulegającym ekspresji w hepatocytach, natomiast w innych typach komórek jej ekspresję mogą zwiększać cytokiny o działaniu prozapalnym [32]. Arginaza II jest enzymem mitochondrialnym obecnym w różnych komórkach i tkankach, przede wszystkim w prostaty, mózgu i nerkach [23].

Znaczenie arginazy niezwiązanej z cyklem mocznikowym upatruje się w regulacji podziałów komórkowych i powstawaniu tkanki łącznej przede wszystkim w warunkach przewlekłego zapalenia. L-ornityna jest prekursorem poliamin (putrescyny, spermidyny, sperminy) biorących udział w kontroli proliferacji komórek oraz prolina – aminokwasu limitującego wytwarzanie kolagenu. Zwiększona aktywność arginazy jest czynnikiem sprzyjającym rozrostowi miocytów śluzniczych naczyń [87] i komórek śródbłonna [42].

Regulacja ekspresji arginazy w płucach

Zimmerman i wsp. posługując się techniką mikromacierzy DNA poddali analizie mRNA obecne w płucach myszy z astmą eksperymentalną. Przebadano 12422 genów i wykazano wzmożoną ekspresję 291. Wśród nich znalazły

się geny związane z metabolizmem aminokwasu L-argininy, w tym geny arginazy I i II. Metodą hybrydyzacji *in situ* oraz metodami immunohistochemicznymi uwidoczono obecność arginazy I w drogach oddechowych. Pośród różnych komórek obecnych w nacieku zapalnym, makrofagi okazały się głównym źródłem tego enzymu [94].

Zwiększoną ekspresję arginazy wykazano także w biopłatach z płuc osób chorych na astmę oskrzelową, gdzie uwidaczniała się w makrofagach i w komórkach nabłonka wyściełającego drogi oddechowe. Wcześniej prowadzone badania polegające na detekcji arginazy i poliamin w płucach chorych na astmę wskazywały właśnie na komórki nabłonkowe jako miejsce, gdzie związki te występują w największych ilościach [28].

Równowaga odpowiedzi immunologicznej w astmie, jak zostało wspomniane we wstępie, jest przesunięta na korzyść typu Th₂. Do cytokin wydzielanych przez limfocyty CD4⁺ Th₂ zaliczamy m.in. IL-4 i IL-13 o potwierdzonym znaczeniu dla rozwoju przewlekłego zapalenia dróg oddechowych i nadreaktywności oskrzeli w astmie. IL-4 i IL-13 wzmagają ekspresję arginazy I i II. [95]. Myszy transgeniczne ze zwiększoną ekspresją IL-4 i astmą eksperymentalną cechuje nieznacznie podwyższony poziom arginazy II i bardzo wysoki arginazy I [64].

L-ornityna w zapaleniu i przebudowie dróg oddechowych

Powstająca z argininy pod wpływem arginazy L-ornityna jest substratem do syntezy putrescyny z udziałem dekarboksylazy ornitynowej (ryc.4). Putrescyna jest z kolei wyjściowym związkiem do syntezy innych poliamin – spermidyny i sperminy. Jako polikationy poliaminy oddziałują z kwasami nukleinowymi, zarówno RNA jak i DNA, regulują funkcje komórek, w tym ich wzrost, podział i różnicowanie [76]. Inhibitor dekarboksylazy ornitynowej – difluorometyloornityna (DFMO) – skutecznie hamował wzrost i różnicowanie komórek oraz znalazł zastosowanie w chemioterapii przeciwnowotworowej w raku piersi [48], pęcherza moczowego [45] i prostaty [35].

U chorych na astmę stężenie poliamin w osoczu jest podwyższone [39]. Nie bez znaczenia w tej chorobie jest moż-

liwość modulacji przez poliaminy interakcji mastocytu z alergenem [82]. Na uwagę zasługuje też to, że poliaminy działają kurcząco na miocyty gładkie [73] przez co mogą nasilać skurcz oskrzeli.

Oprócz karboksylazy drugim enzymem, którego substratem jest ornityna jest aminotransferaza. Przekształca ona ornitynę w prolinę – podstawowy aminokwas w syntezie kolagenu. Ornityna i prolina po wydzieleniu z komórek, w których dochodzi do ekspresji arginazy (makrofagów) są transportowane do fibroblastów. W tych ostatnich prolina po hydroksylacji zostaje wykorzystana do syntezy kolagenu, co wiąże się z jego gromadzeniem pod nabłonkiem dróg oddechowych [63]. Jest to kolejna, oprócz przerostu i hiperplazji mięśniówki gładkiej, cecha przebudowy mięszu płucnego w astmie.

Zależność między arginazą a NOS

Arginaza i NOS są enzymami działającymi na ten sam substrat – L-argininę. Konkurują o ten aminokwas i wzajemnie wpływają na swoje działanie w komórce.

N^o-hydroksy-L-arginina powstająca podczas syntezy tlenu azotu jest silnym inhibitorem arginazy I i II [96]. Poli-L-arginina – produkt metabolizmu L-ornityny, hamuje transport argininy do komórki [84]. Ponieważ NOS jest bardziej wrażliwa na niedobór substratu dochodzi do przesunięcia równowagi metabolizmu argininy na korzyść arginazy [52].

Arginaza zmniejsza dostępność argininy dla syntazy tlenu azotu. Upośledza to działanie nNOS, iNOS oraz eNOS. Doświadczalnie wykazano hamujący wpływ arginazy na nNOS w astmie. Zwiększona aktywność arginazy upośledza relaksację oskrzeli powodowaną działaniem hamujących neuronów nieadrenergicznych i niecholinergiczych – iNANC [46].

Zwiększona aktywność arginazy sprzyja wytwarzaniu anionu ponadtlenkowego przez iNOS, a także upośledza translację białka tego enzymu. W makrofagach, w których doszło do jednoczesnej ekspresji iNOS i arginazy, syntaza tlenu azotu oprócz NO• wytwarza w dużych ilościach O₂⁻ [91]. Zaburzenia u myszy transgeniczných ze zwiększoną ekspresją arginazy I są związane ze zwiększoną nitracją reszt tyrozynowych białek w wyniku wzmożonego wytwarzania ONOO⁻ [40]. W makrofagach poddanych stymulacji IL-13 dochodzi do zmniejszenia syntezy białka iNOS *de novo* bez wpływu na ilość iNOS mRNA w komórce. IL-13 pobudza tu ekspresję arginazy, a jej działanie znosi dodanie większej ilości argininy do pożywki [14].

Tlenek azotu jest inhibitorem dekarboksylazy ornityny i tym samym ogranicza powstawanie poliamid [4]. Ze względu na znaczenie tych związków w przebudowie dróg oddechowych, a także wobec opisanego wcześniej hamującego wpływu NO• na proliferację mięśni gładkich, niedobór tlenu azotu wydaje się promować przebudowę oskrzeli w astmie.

Arginaza w astmie – perspektywy

W badaniach nad mechanizmami molekularnymi i komórkowymi leżącymi u podłoża rozwoju astmy i jej objawów klinicznych bardzo długo skupiano się na argininie w kontekście prekursora tlenu azotu. W pracy tej zaprezentowano szersze spojrzenie na metabolizm argininy w astmie. Oprócz podkreślenia ważnej roli tlenu azotu, wskazano na zaburzenia jego homeostazy wynikające ze zmian na innych szlakach metabolicznych argininy. Przytoczone przykłady znaczenia arginazy w patogenezie astmy zachęcają do rozważenia nowych możliwości diagnostycznych i strategii terapeutycznych, których celem miałyby być modulacja aktywności arginazy [68].

Arginaza może się stać użytecznym markerem, pomocnym w diagnozowaniu progresji i ciężkości astmy [70]. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w genie arginazy I wykazują związek z atopią, a w genie arginazy II – z astmą [43]. Ponad dwadzieścia lat temu badano aktywność arginazy w płwocinie pacjentów. Spostrzeżono wtedy jej zwiększenie u chorych na astmę oskrzelową [38]. Znaczenie tej obserwacji wydawało się wówczas niepewne i nie znalazło zadowalającej interpretacji. Tymczasem przytoczone w tej pracy przykłady uwikłania arginazy w różne mechanizmy związane z patofizjologią astmy rzucają nowe światło na te wyniki. Warto też zwrócić uwagę na zwiększoną aktywność arginazy i wysokie stężenie poliamin w surowicy chorych na astmę [52,97].

Znaczenie deficytu L-argininy dla rozwoju nadreaktywności oskrzeli pozwala wskazać na korzyści płynące z egzogenego dostarczenia tego aminokwasu np. wziewnie w niepowikłanej astmie [70]. W ten sposób nNOS i eNOS można by zapewnić substrat do wytwarzania NO• o działaniu bronchoprotekcyjnym. Jednoczesne hamowanie iNOS za pomocą przeciwzapalnie działających glikokortykosteroidów pod kontrolą stężenia tlenu azotu w wydychanym powietrzu, pozwoliłoby na przywrócenie fizjologicznej homeostazy tlenu azotu w układzie oddechowym. Dla pełnego wyrównania zaburzeń metabolizmu arginazy w astmie do tak skojarzonego leczenia należałoby dodać inhibitor arginazy, który pozwoliłby zapobiec przebudowie oskrzeli.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aktan F.: iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.*, 2004; 75: 639–653
- [2] Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 2001; 357: 593–615
- [3] Baldus S., Eiserich J.P., Mani A., Castro L., Figueroa M., Chumley P., Ma W., Tousson A., White C.R., Bullard D.C., Brennan M.L., Luscis A.J., Moore K.P., Freeman B.A.: Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J. Clin. Invest.*, 2001; 108: 1759–1770
- [4] Bauer P.M., Buga G.M., Fukuto J.M., Pegg A.E., Ignarro L.J.: Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 34458–34464
- [5] Berkman N., Avital A., Breuer R., Bardach E., Springer C., Godfrey S.: Exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma: comparison with bronchial provocation tests. *Thorax*, 2005; 60: 383–388
- [6] Biełkowska-Haba M.: Tlenek azotu wytwarzany przez leukocyty płucne w astmie oskrzelowej. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 584–601



- [7] Boeckxstaens G.E., Pelckmans P.A.: Nitric oxide and the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.*, 1997; 118: 925–937
- [8] Bogdan C.: Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, 2001; 2: 907–916
- [9] Bousquet J., Jeffery P.K., Busse W.W., Johnson M., Vignola A.M.: Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000; 161: 1720–1745
- [10] Broillet M.C.: S-nitrosylation of proteins. *Cell Mol. Life Sci.*, 1999; 55: 1036–1042
- [11] Burney S., Caulfield J.L., Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.: The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.*, 1999; 424: 37–49
- [12] Crawford J.H., Isbell T.S., Huang Z., Shiva S., Chacko B.K., Schechter A.N., Darley-Usmar V.M., Kerby J.D., Lang J.D. Jr, Kraus D., Ho C., Gladwin M.T., Patel R.P.: Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood*, 2006; 107: 566–574
- [13] Dejam A., Hunter C.J., Schechter A.N., Gladwin M.T.: Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2004; 32: 423–429
- [14] El-Gayar S., Thuring-Nahler H., Pfeilschifter J., Rollinghoff M., Bogdan C.: Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J. Immunol.*, 2003; 171: 4561–4568
- [15] Elias J.A., Lee C.G., Zheng T., Ma B., Homer R.J., Zhu Z.: New insights into the pathogenesis of asthma. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 291–297
- [16] Fang K., Johns R., Macdonald T., Kinter M., Gaston B.: S-nitroso-glutathione breakdown prevents airway smooth muscle relaxation in the guinea pig. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2000; 279: L716–L721
- [17] Feletou M., Lonchampt M., Coge F., Galizzi J.P., Bassoullet C., Merial C., Robineau P., Boutin J.A., Huang P.L., Vanhoutte P.M., Canet E.: Regulation of murine airway responsiveness by endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2001; 281: L258–L267
- [18] Forman H.J., Fukuto J.M., Torres M.: Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004; 287: C246–C256
- [19] Forstermann U., Boissel J.P., Kleinert H.: Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.*, 1998; 12: 773–790
- [20] Furchgott R.F., Zawadzki J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373–376
- [21] Ganster R.W., Taylor B.S., Shao L., Geller D.A.: Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 8638–8643
- [22] Gibson P.G., Henry R.L., Thomas P.: Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *Eur. Respir. J.*, 2000; 16:1008–1015
- [23] Gotoh T., Araki M., Mori M.: Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 233: 487–491
- [24] Groves J.T., Wang C.C.: Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000; 4: 687–695
- [25] Hamad A.M., Knox A.J.: Mechanisms mediating the antiproliferative effects of nitric oxide in cultured human airway smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, 2001; 506: 91–96
- [26] Hammermann R., Hirschmann J., Hey C., Mossner J., Folkerts G., Nijkamp F.P., Wessler I., Racke K.: Cationic proteins inhibit L-arginine uptake in rat alveolar macrophages and tracheal epithelial cells. Implications for nitric oxide synthesis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1999; 21: 155–162
- [27] Hansel T.T., Kharitonov S.A., Donnelly L.E., Erin E.M., Currie M.G., Moore W.M., Manning P.T., Recker D.P., Barnes P.J.: A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB J.*, 2003; 17: 1298–1300
- [28] Hoet P.H., Nemery B.: Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2000; 278: L417–L433
- [29] Humbert M., Menz G., Ying S., Corrigan C.J., Robinson D.S., Durham S.R., Kay A.B.: The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol. Today*, 1999; 20: 528–533
- [30] Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 9265–9269
- [31] Iwakiri Y., Tsai M.H., McCabe T.J., Gratton J.P., Fulton D., Groszmann R.J., Sessa W.C.: Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2002; 282: H2084–H2090
- [32] Iyer R., Jenkinson C.P., Vockley J.G., Kern R.M., Grody W.W., Cederbaum S.: The human arginases and arginase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.*, 1998; 21: 86–100
- [33] Jain B., Rubinstein I., Robbins R.A., Leise K.L., Sisson J.H.: Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993; 191: 83–88
- [34] Jarvis D., Luczynska C., Chinn S., Burney P.: The association of hepatitis A and *Helicobacter pylori* with sensitization to common allergens, asthma and hay fever in a population of young British adults. *Allergy*, 2004; 59: 1063–1067
- [35] Kadmon D.: Chemoprevention in prostate cancer: the role of difluoromethylornithine (DFMO). *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 1992; 16H: 122–127
- [36] Kesler B.S., Mazzone S.B., Canning B.J.: Nitric oxide-dependent modulation of smooth-muscle tone by airway parasympathetic nerves. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002; 165: 481–488
- [37] Kleinert H., Euchenhofer C., Ihrig-Biedert I., Forstermann U.: Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol. Pharmacol.*, 1996; 49: 15–21
- [38] Kochański L., Kossmann S., Rogala E., Dwornicki J.: Sputum arginase activity in bronchial asthma. *Pneumonol. Pol.*, 1980; 48: 329–332
- [39] Kurosawa M., Shimizu Y., Tsukagoshi H., Ueki M.: Elevated levels of peripheral-blood, naturally occurring aliphatic polyamines in bronchial asthmatic patients with active symptoms. *Allergy*, 1992; 47: 638–643
- [40] Kwikkers K.L., Ruijter J.M., Labruyere W.T., McMahon K.K., Lamers W.H.: Effect of arginine deficiency on arginine-dependent post-translational protein modifications in mice. *Br. J. Nutr.*, 2005; 93: 183–189
- [41] Lane C., Knight D., Burgess S., Franklin P., Horak F., Legg J., Moeller A., Stick S.: Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath. *Thorax*, 2004; 59: 757–760
- [42] Li H., Meininger C.J., Kelly K.A., Hawker J.R. Jr, Morris S.M. Jr, Wu G.: Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2002; 282: R64–R69
- [43] Li H., Romieu I., Sienra-Monge J.J., Ramirez-Aguilar M., Estela Del Rio-Navarro B., Kistner E.O., Gjessing H.K., Lara-Sanchez Idel C., Chiu G.Y., London S.J.: Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006; 117: 119–126
- [44] Lincoln T.M., Komalavilas P.: Cyclic GMP-mediated signaling mechanism in smooth muscle. W: Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, red.: L.J. Ignarro. Academic Press, London 2000, 401–428
- [45] Loprinzi C.L., Messing E.M.: A prospective clinical trial of difluoromethylornithine (DFMO) in patients with resected superficial bladder cancer. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 1992; 161: 153–155
- [46] Maarsingh H., Leusink J., Bos I.S., Zaagsma J., Meurs H.: Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Respir. Res.*, 2006; 7: 6
- [47] Mallozzi C., Di Stasi A.M., Minetti M.: Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3. *FASEB J.*, 1997; 11: 1281–1290
- [48] Manni A., Washington S., Mauger D., Hackett D.A., Verderame M.F.: Cellular mechanisms mediating the anti-invasive properties of the ornithine decarboxylase inhibitor alpha-difluoromethylornithine (DFMO) in human breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 2004; 21: 461–467
- [49] Mannick J.B., Schonhoff C.M.: NO means no and yes: regulation of cell signaling by protein nitrosylation. *Free Radic. Res.*, 2004; 38: 1–7
- [50] Meurs H., Maarsingh H., Zaagsma J.: Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003; 24: 450–455
- [51] Meurs H., Schuurman F.E., Duyvendak M., Zaagsma J.: Deficiency of nitric oxide in polycation-induced airway hyperreactivity. *Br. J. Pharmacol.*, 1999; 126: 559–562

- [52] Morris C.R., Poljakovic M., Lavrisa L., Machado L., Kuypers F.A., Morris S.M. Jr.: Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2004; 170: 148–153
- [53] Morris S.M. Jr.: Enzymes of arginine metabolism. *J. Nutr.*, 2004; 134: 2743S–2747S
- [54] Morris S.M. Jr.: Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2002; 22: 87–105
- [55] Murad F., Waldman S., Molina C., Bennett B., Leitman D.: Regulation and role of guanlylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1987; 249: 65–76
- [56] NHLBI/WHO Workshop Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NIH Publication No 02-3659. Uaktualniony raport 2006 udestępniony na stronie <http://www.ginasthma.org/Guidelineitem.asp?11=2&l2=1&intId=60>
- [57] O'Donnell V.B., Coles B., Lewis M.J., Crews B.C., Marnett L.J., Freeman B.A.: Catalytic consumption of nitric oxide by prostaglandin H synthase-1 regulates platelet function. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 38239–38244
- [58] O'Donnell V.B., Taylor K.B., Parthasarathy S., Kuhn H., Koesling D., Friebe A., Bloodsworth A., Darley-Usmar V.M., Freeman B.A.: 15-Lipoxygenase catalytically consumes nitric oxide and impairs activation of guanlylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 20083–20091
- [59] Pabelick C.M., Warner D.O., Perkins W.J., Jones K.A.: S-nitrosoglutathione-induced decrease in calcium sensitivity of airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2000; 278: L521–L527
- [60] Paredi P., Kharitonov S.A., Barnes P.J.: Analysis of expired air for oxidation products. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002; 166: S31–S37
- [61] Patel H.J., Belvisi M.G., Donnelly L.E., Yacoub M.H., Chung K.F., Mitchell J.A.: Constitutive expressions of type I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an antiproliferative role. *FASEB J.*, 1999; 13: 1810–1816
- [62] Platts-Mills T.A., Wheatley L.M.: The role of allergy and atopy in asthma. *Curr. Opin. Pulmon. Med.*, 1996; 2: 29–34
- [63] Que L.G., Kantrow S.P., Jenkins C.P., Piantadosi C.A., Huang Y.C.: Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am. J. Physiol.*, 1998; 275: L96–L102
- [64] Rankin J.A., Picarella D.E., Geba G.P., Temann U.A., Prasad B., DiCosmo B., Tarallo A., Stripp B., Whitsett J., Flavell R.A.: Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 7821–7825
- [65] Reynaert N.L., Ckless K., Wouters E.F., van der Vliet A., Janssen-Heininger Y.M.: Nitric oxide and redox signaling in allergic airway inflammation. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2005; 7: 129–143
- [66] Ricciardolo F.L., Geppetti P., Mistretta A., Nadel J.A., Sapienza M.A., Bellofiore S., Di Maria G.U.: Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of inhibition of nitric oxide synthesis in bradykinin-induced asthma. *Lancet*, 1996; 348: 374–377
- [67] Ricciardolo F.L., Sterk P.J., Gaston B., Folkerts G.: Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 731–765
- [68] Ricciardolo F.L., Zaagsma J., Meurs H.: The therapeutic potential of drugs targeting the arginase pathway in asthma. *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, 2005; 14: 1221–1231
- [69] Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M., Freeman B.A.: Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 26066–26075
- [70] Sapienza M.A., Kharitonov S.A., Horvath I., Chung K.F., Barnes P.J.: Effect of inhaled L-arginine on exhaled nitric oxide in normal and asthmatic subjects. *Thorax*, 1998; 53: 172–175
- [71] Smith A.D., Cowan J.O., Brassett K.P., Herbison G.P., Taylor D.R.: Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 26: 2163–2173
- [72] Souza J.M., Choi I., Chen Q., Weisse M., Daikhin E., Yudkoff M., Obin M., Ara J., Horwitz J., Ischiropoulos H.: Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000; 380: 360–366
- [73] Sward K., Pato M.D., Nilsson B.O., Nordstrom I., Hellstrand P.: Polyamines inhibit myosin phosphatase and increase LC20 phosphorylation and force in smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 1995; 269: C563–C571
- [74] Ścibior D., Czczot H.: Arginina – metabolizm i funkcje w organizmie człowieka. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 321–332
- [75] Taylor B.S., Geller D.A.: Regulation of the inducible nitric oxide synthase gene. W: *Nitric oxide and inflammation*, red: D. Salvemini, T.R. Billiard, Y. Vodovotz. Birkhauser, Basel 2001, 1–26
- [76] Thomas T., Thomas T.J.: Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001; 58: 244–258
- [77] Torres J., Sharpe M.A., Rosquist A., Cooper C.E., Wilson M.T.: Cytochrome c oxidase rapidly metabolises nitric oxide to nitrite. *FEBS Lett.*, 2000; 475: 263–266
- [78] Umetsu D.T., McIntire J.J., Akbari O., Macaubas C., DeKruyff R.H.: Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 715–720
- [79] van der Vliet A., Hoen P.A., Wong P.S., Bast A., Cross C.E.: Formation of S-nitrosothiols via direct nucleophilic nitrosation of thiols by peroxynitrite with elimination of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 30255–30262
- [80] Vercelli D.: Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma? *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 1815–1817
- [81] Vignola A.M., Chanez P., Campbell A.M., Souques F., Lebel B., Enander L., Bousquet J.: Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 157: 403–409
- [82] Vliagoftis H., Boucher W.S., Mak L.L., Theoharides T.C.: Inhibition of mast cell secretion by oxidation products of natural polyamines. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 43: 2237–2245
- [83] Vodovotz Y., Barcellos-Hoff M.: Direct and indirect modulation of the inducible nitric oxide synthase by nitric oxide: feedback mechanism in inflammation. W: *Nitric oxide and inflammation*, red: D. Salvemini, T.R. Billiard, Y. Vodovotz. Birkhauser, Basel 2001, 41–58
- [84] von Hertzen L., Klaukka T., Mattila H., Haahtela T.: Mycobacterium tuberculosis infection and the subsequent development of asthma and allergic conditions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999; 104: 1211–1214
- [85] Wanstall J.C., Homer K.L., Doggrel S.A.: Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2005; 3: 41–53
- [86] Ward G.J.K., Barnes P.J., Springall D.R., Abelli L., Tadjkarimi S., Yacoub M.H., Polak J.M., Belvisi M.G.: Distribution of human iNANC bronchodilator and nitric oxide-immunoreactive nerves. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1995; 13: 175–184
- [87] Wei L.H., Wu G., Morris S.M. Jr, Ignarro L.J.: Elevated arginase I expression in rat aortic smooth muscle cells increases cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 9260–9264
- [88] Wilson N.: Measurement of airway inflammation in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2002; 8: 25–32
- [89] Wink D.A., Mitchell J.B.: Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998; 25: 434–456
- [90] Xia Y., Zweier L.: Superoxide anion release from inducible nitric oxide synthase. W: *Nitric oxide and inflammation*, red: D. Salvemini, T.R. Billiard, Y. Vodovotz. Birkhauser, Basel 2001, 27–40
- [91] Xia Y., Zweier J.L.: Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 6954–6958
- [92] Xue C., Botkin S.J., Johns R.A.: Localization of endothelial NOS at the basal microtubule membrane in ciliated epithelium of rat lung. *J. Histochem. Cytochem.*, 1996; 44: 463–471
- [93] Zanconato S., Carraro S., Corradi M., Alinovi R., Pasquale M.F., Piacentini G., Zacchello F., Baraldi E.: Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004; 113: 257–263
- [94] Zimmermann N., King N.E., Laporte J., Yang M., Mishra A., Pope S.M., Muntel E.E., Witte D.P., Pegg A.A., Foster P.S., Hamid Q., Rothenberg M.E.: Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 1863–1874
- [95] Zimmermann N., Mishra A., King N.E., Fulkerson P.C., Doecker M.P., Nikolaidis N.M., Kindinger L.E., Moulton E.A., Aronow B.J., Rothenberg M.E.: Transcript signatures in experimental asthma: identification of STAT6-dependent and independent pathways. *J. Immunol.*, 2004; 172: 1815–1824
- [96] Zimmermann N., Rothenberg M.E.: The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006; 533: 253–262

