

Azot-monoksid i kontraktilnost skeletnog mišića

Radan Stojanović*, Milica Prostran*, Zoran Todorović*, Sonja Vučković*,
Zorica Nešić*, Slobodan Milovanović†

Medicinski fakultet, *Institut za kliničku farmakologiju, farmakologiju i
toksikologiju, †Vojnomedicinska akademija, Beograd

K l j u č n e r e č i : azot monoksid; mišići, skeletni; mišići, kontrakcija.

K e y w o r d s : nitric oxide; muscle, skeletal; muscle contraction.

Poslednjih godina molekul azot-monoksida (NO) identifikovan je kao važan fiziološki, intracelularni posrednik u mnogim organskim sistemima. Noviji podaci ukazuju da skeletni mišići stvaraju NO koji ima ulogu endogenog modulatora kontraktilnosti skeletnih mišića (1–3). Deo svojih efekata na kontraktilnost skeletne muskulature NO ostvaruje indirektnim putem – preko sistema gvanilatne ciklaze i cGMP.

U našoj laboratoriji izučavana je farmakološka modulacija kontraktilnosti izolovanih skeletnih mišića pacova i zamoraca. Posebna pažnja posvećena je dejstvu modulatora adrenergičkog sistema (agonisti i antagonisti adrenergičkih receptora, forskolin, metilksantini), kao i intracelularnih posrednika (cGMP, cAMP, kalcijum) na kontrakciju izolovane hemidijafragme pacova stimulisane direktnom i indirektnom električnom stimulacijom (4–9).

Opravdana je hipoteza da se dejstva adrenergičkih lekova i NO ukrštaju na nivou pomenutih intracelularnih posrednika, kao i da bi interakcija između ovih supstanci mogla imati veliki klinički značaj (npr. u respiratornim oboljenjima, neurološkim poremećajima).

Sinteza azot-monoksida u skeletnom mišiću

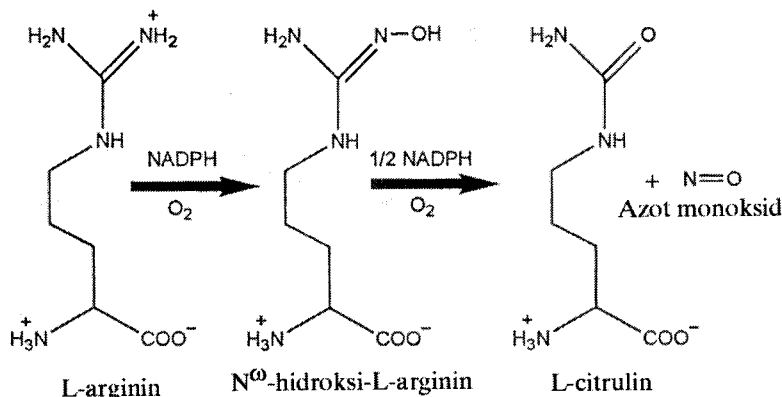
Biosinteza azot-monoksida iz L-arginina, pod dejstvom enzima sintaze azot-monoksida (NOS), odigrava se u gotovo svim ćelijama sisara. Enzim se javlja u tri glavne izoforme (10):

- nervna konstitutivna (tip I),
- endotelna konstitutivna (tip III), kao i
- inducibilna (tip II).

Nervna konstitutivna sintaza azot-monoksida (NOS tip I).– Prisustvo nervne konstitutivne izoforme enzima dokazano je u centralnom i perifernom nervnom sistemu, ali i u ćelijama skeletne muskulature ljudi, pacova i zamoraca (1). U skeletnom mišiću glodara dokazano je prisustvo tipa I izoforme enzima u brzim crvenim vlaknima (npr. dijafragma), sa glavnom lokalizacijom u blizini sarkoleme. Aktivnost enzima regulisana je fiziološkim promenama u intracelularnoj koncentraciji jona kalcijuma (11).

Endotelna konstitutivna sintaza azot-monoksida (NOS tip III).– Ova izoforma enzima takođe je zavisna od kalcijuma (*calcium-dependent*) sa glavnom lokalizacijom u vaskularnim endotelnim ćelijama. Prisustvo NOS tip III pokazano je, takođe, i u mitohondrijama skeletnog mišića (1). Mišićne ćelije su prve kod kojih je pokazana konstitutivna koekspresija obe izoforme NOS.

Inducibilna sintaza azot-monoksida (NOS tip II).– Za razliku od obe konstitutivne, ova izoforma enzima poseduje aktivnost nezavisnu od koncentracije jona kalcijuma. Sintetiše se *de novo* u različitim i brojnim ćelijama, uključujući ćelije skeletnih mišića, makrofage, glatke mišićne ćelije, kardiomiocyte i mikrogliju kao reakcija na inflamatorne promene. Najznačajniji induktori sinteze su citokini i endotoksin. Svaka izoforma enzima NOS sintetiše azot-monoksid iz L-arginina. Reakcija zahteva molekulski kiseonik i NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) kao kosupstrat; citrulin se stvara kao krajnji produkt; kofaktori su FAD (flavin adenin dinukleotid), tetrahidrobiopterin, hem i kalmodulin (slika 1). Vezivanje kalmodulina proteina koji vezuje kalcijum za obe konstitutivne izoforme enzima NOS zavisno je od kalcijuma i odigrava se samo u uslovima



Sl. 1 – Biosinteza azot-monoksida (NO). Molekulski kiseonik (O_2) se inkorporiše u NO i L-citrulin, preko intermedijarnog molekula N^ω -hidroksi-L-arginina, posredstvom enzima NO sintaze. NADPH je esencijalni kofaktor za tu reakciju. Prema Christopoulosu (12).

njegove visoke intracelularne koncentracije ($0,3 \mu\text{mol}$). Suprotno, vezivanje kalmodulina za inducibilnu NOS nezavisno je od koncentracije kalcijuma (3).

Prema tome, u skeletnom mišiću prisutne su sve tri izoforme enzima.

Stvoreni NO je mali, električno neutralan molekul, koji zahvaljujući visokoj lipofilnosti lako difunduje kroz membrane. Tako azot-monoksid može da ispolji autokrine i parakrine efekte. Pod bazalnim uslovima skeletni mišići sintetišu NO u maloj količini (2), a mišićna vlakna sadrže mnogo „ciljeva“ sa kojima NO može stupiti u interakciju, tako da se u pasivnom mišiću mogu očekivati uglavnom autokrini efekti NO. Međutim, u uslovima stimulacije sinteze NO (npr. vežbanje, zapaljenje i dr.) dolazi do veće difuzije NO i povećanja mogućnosti za ispoljavanje parakrinog dejstva (3).

Sinteza NO pod dejstvom konstitutivnih izoformi enzima NOS, povećana je tokom mišićne aktivnosti, kao i ostali procesi zavisni od kalcijuma. Pokazano je da se oslobađanje NO povećava za 50–200% tokom uzastopnih mišićnih kontrakcija (2).

Procesi stvaranja i distribucije slobodnih kiseoničnih radikala u skeletnom mišiću slični su procesima koji važe za NO. Njihovo prisustvo pokazano je, kako u citozolu, tako i u ekstracelularnom prostoru pasivnih mišićnih vlakana (13, 14). Takođe, tokom uzastopnih mišićnih kontrakcija povećava se sinteza slobodnih kiseoničkih radikala. Veruje se da ovi produkti oksidacije nastaju u mitohondrijama prilikom transporta elektrona i da prolaze ćelijske membrane kroz anjonske kanale (15). Značajna je njihova interakcija sa NO jer učestvuju u reakcijama zamene elektrona, a takođe konkuriraju za iste redoks-senzitivne „ciljeve“ u mišiću. Veruje se da pod normalnim uslovima mogu imati bitnu ulogu u kontroli fizioloških procesa u mišiću, a takođe indukuju i stvaranje endogenih antioksidansa.

Međutim, u toku perioda snažne mišićne aktivnosti slobodni kiseonički radikali mogu oksidisati polinezasićene masne kiseline i dovesti do gubitka integriteta ćelijske membrane i povećane mikrovaskularne permeabilnosti (13).

Efekti azot-monoksida na kontraktilnost skeletnog mišića

Efekti NO na kontraktilnost skeletnog mišića mogu biti posledica njegovog direktnog i indirektnog dejstva.

Direktno dejstvo NO - podrazumeva interakciju azot-monoksida sa rijanodinskim receptorom koji deluje kao put za oslobađanje Ca^{2+} jona iz sarkoplazmatskog retikuluma u citoplazmu. U skeletnom mišiću postoji direktna korelacija između kontraktilnosti i količine kalcijuma oslobođenog iz sarkoplazmatskog retikuluma kroz kalcijumske kanale „ Ca^{2+} -release channels“.

Oksidacija kanala (rijanodinskog receptora) povećava njegovu aktivnost dovodeći do stvaranja disulfidnih veza između susednih subjedinica rijanodinskog tetramera, dok alkilacija hiperreaktivnih sulfidrilnih grupa kanala inhibiše funkciju kanala i blokira stvaranje veza između subjedinica (16). Nije poznato da li su iste sulfhidrilne grupe uključene u procese oksidacije i alkilacije. Sposobnost oksidansa da povećaju aktivnost rijanodinskog receptora može objasniti njihove efekte na kontraktilnost skeletnog mišića.

Efekti NO na rijanodinskom tetrameru su kontroverzni. U bazalnim uslovima, kada se sintetiše u manjoj količini (2), NO ispoljava depresivno dejstvo na kontraktilnost skeletnog mišića: pretpostavlja se da sprečava oksidaciju regulatornih sulfidrilnih grupa rijanodinskog receptora. S druge strane, NO u višim koncentracijama ispoljava stimulantne efekte (17). Pokazano je da NO donori inhibišu aktivnost kanala (18), ali je takođe nađeno i da NO donori mogu aktivirati kanal (19). Moguće je da su divergentni efekti NO uslovljeni razlikama u uslovima pod kojima se odvija reakcija, količini stvorenog NO i krajnjim produktima reakcije (20).

Takođe je bitna i interakcija NO sa reaktivnim kiseoničkim radikalima koja se odigrava na nivou rijanodinskog receptora.

Postoje podaci koji ukazuju da NO može stupiti u interakciju i sa drugim „ciljevima“ u skeletnom mišiću (npr. Ca^{2+} -ATP-aza sarkoplazmatskog retikuluma) i na taj način modifikovati proces ekscitacija-kontrakcija.

Indirektno dejstvo - podrazumeva interakcije NO i cGMP. U skeletnim mišićima je, pre više od dvadeset godina, otkrivena solubilna gvanilatna ciklaza osetljiva na NO (21), iako je njena aktivnost u skeletnim mišićima manja nego u većini drugih tkiva. Azot-monoksid je vrlo snažan aktivator solubilne gvanilatne ciklaze. Aktivacija enzima nastaje kao rezultat vezivanja NO za hem grupu enzima. Stvoreni cGMP ima ulogu drugog glasnika koji reguliše tri glavne grupe efektnih proteina:

- cGMP- zavisne protein kinaze,
- cGMP- stimulisane/inhibisane fosfodiesteraze, kao i
- cGMP- zavisne jonske kanale.

Efektorni proteini, dalje, imaju ulogu u fosforilaciji proteina, metabolizmu cikličnih nukleotida, odnosno regulišu ulazak katjona kroz ćelijske membrane (22).

Lau i saradnici (23) potvrdili su funkcionalnu povezanost između cGMP i mišićne aktivnosti. Takođe su pokušali da dovedu u vezu stvaranje cGMP i aktivnost NOS. Pokazali su porast nivoa cGMP za 250% posle električno izazvanih kontrakcija *m. extensor digitorum longus*. Pri tome NOS inhibitori nisu menjali koncentraciju cGMP u pasivnom mišiću, ali su blokirali porast koncentracije izazvan električnom stimulacijom mišića.

Više koncentracije NO, sintetisanog od strane inducibilne izoforme NOS, mogu imati pro-oksidantna dejstva.

Modulatori sinteze azot-monoksida

Razne supstance mogu se koristiti za ispitivanje delovanja različitih izoformi enzima NOS. Većina lekova korišćenih u ranijim studijama nije posedovala znatniju selektivnost prema pojedinim izoformama enzima. Novije, selektivnije supstance omogućuju proučavanje uloge različitih formi izoenzima NOS u fiziološkim i patološkim procesima.

N-metil-L-arginin (L-NMA) je prototip neselektivnog inhibitora NOS (24). Posедује deset puta veći afinitet za vezivanje za supstratsko mesto na NOS od L-arginina i izaziva ireverzibilnu inaktivaciju inducibilne (tip II) i neuralne (tip I) NOS (25–27).

N-nitro-L-arginin (L-NNA) nastaje enzimskom ili neenzimskom hidrolizom neaktivnog proleka, N-nitro-L-arginin metil-estra (L-NAME) (28). L-NNA ispoljava znatnu selektivnost prema konstitutivnim formama izoenzima. Sposobnost nitroderivata je veća, jer blokiraju i sintezu NO i stvaranje superoksidnih anjona (29). Disocijacija kompleksa koji čine enzim i inhibitor je spora, što čini ovu supstancu visokopotentnim inhibitorom konstitutivnih izoformi NOS.

L-tiocitrulin (L-TC) je snažan inhibitor nervne konstitutivne (tip I) i inducibilne (tip II) izoforme NOS (30). Kao i L-NNA inhibiše sintezu NO i stvaranje superoksidnih anjona, ali za kraće vreme.

7-nitroindazol je selektivni inhibitor nervne (tip I) izoforme NOS. Međutim, u *in vitro* studijama ispoljava skoro jednaku sposobnost za sve tri izoforme enzima (31).

Aminogandin pokazuje veliku selektivnost prema inducibilnoj izoformi enzima NOS (32).

Efekat inhibitora sintaze azot-monoksida na kontraktilnost skeletnih mišića

U našoj laboratoriji posebno su ispitivani efekti inhibitora NOS na kontraktilnost dijafragme pacova pri direktnoj (DES) i indirektnoj (IES) električnoj stimulaciji. Pokazano je da L-NAME, neselektivni inhibitor NOS u bazalnim uslovima (netretiran mišić), ne menja značajno kontraktilnost izolovane hemidijafragme pacova. Međutim, pretretman mišića aminofilinom kvalitativno menja efekte ovog inhibitora. Sa druge strane, natrijum-nitroprusid (donor NO) značajno smanjuje parametre izometrijske kontrakcije izolovane dijafragme pacova pri DES i IES. (33–36). Ovi rezultati, od posebnog značaja za farmakoterapiju respiratornih oboljenja, mogu doprineti boljem objašnjenju uloge endogenog NO u modulaciji kontraktilnosti respiratorne muskulature.

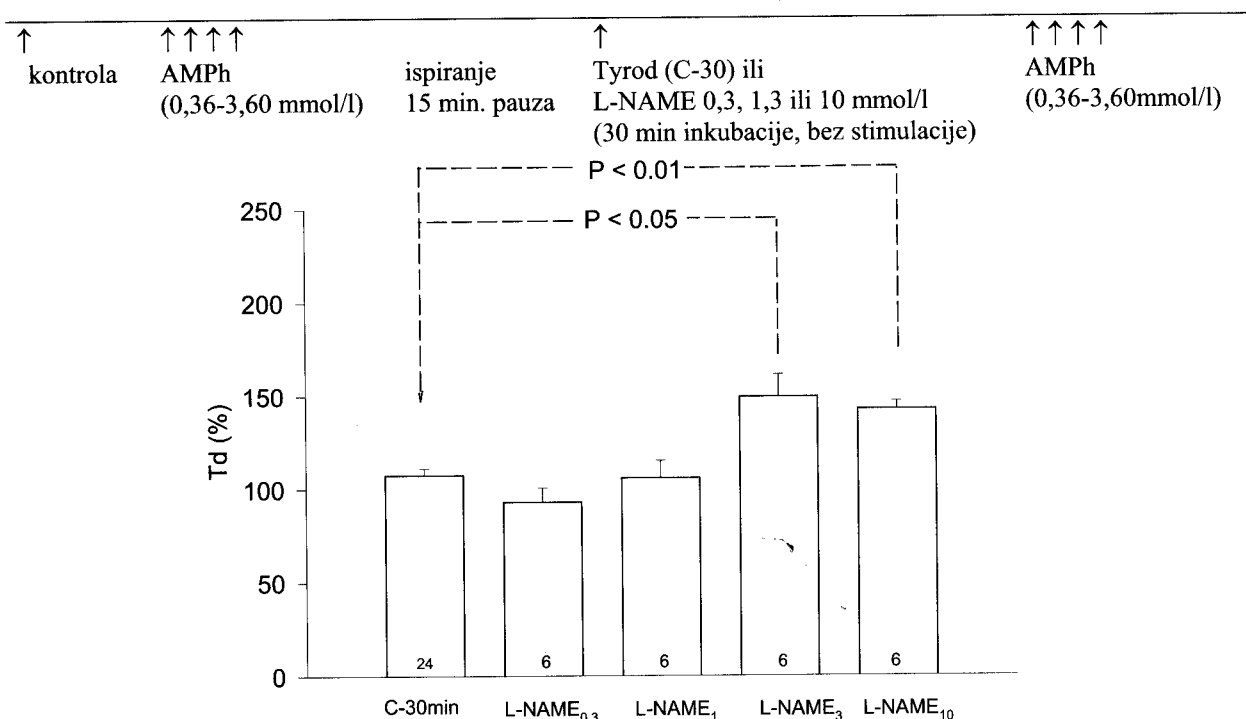
Prema Kobziku i sar. (1), inhibitori NOS potenciraju kontraktilnost izolovane dijafragme pacova. Ovo dejstvo je verovatno specifično i posledica je inhibicije sinteze NO. Balon i Nadler (2) potvrdili su da L-NMMA (10^{-6} mol/l), jedan od NOS inhibitora, značajno smanjuje oslobađanje NO iz *m. extensor digitorum longus* pacova u uslovima *in vitro*. Očigledno je da endogeni NO smanjuje snagu mišićne kontrakcije (1, 3). Sposobnost NO da inhibiše kontraktilnost skeletnih mišića eksperimentno je potvrđena od strane više autora: Abraham i sar.(37) (dijafragma pacova), Amnbiel i sar. (38) (izolovana dijafragma pacova), el-Dwairi i sar. (39) (dijafragma mladunaca i odraslih pacova).

L-NAME, neselektivni inhibitor NOS, u milimolarnim koncentracijama pod našim eksperimentnim uslovima (40) značajno potencira parametre izometrijske kontrakcije izolovane hemidijafragme pacova pri direktnoj supstancijskoj električnoj stimulaciji (slika 2).

Pretretman mišića kumulativnim koncentracijama aminofilina (0,36–3,60 mmol/l) verovatno je izazvao aktivaciju sistema azot monoksida. Poznato je da aminofilin u milimolarnim koncentracijama dovodi do pojačanog ulaska kalcijuma u mišić i porasta njegove intracelularne koncentracije (7, 8). Kako je NOS tip I izoforma enzima zavisna od kalcijuma i lokalizovana postsinaptički, vezana za sarkolemu dijafragme pacova, pojačan ulaz kalcijuma, izazvan aminofilinom, dovodi do njene aktivacije i, verovatno, pojačanog stvaranja NO. Stvoreni NO verovatno može inhibisati kontraktilnost važnog respiratornog mišića (dijafragma).

Poznato je da aminofilin povoljno deluje na kontrakciju zamorenih respiratornih mišića (dijafragme i interkostalnih mišića) (8). Međutim, prema našim rezultatima moguće je da duža primena aminofilina (koncentracija aminofilina primenjenog u našim eksperimentima odgovara terapijskim koncentracijama) (41) izaziva aktivaciju konstitutivnih izoformi sintaze NO. To je i razlog da blokada sinteze

Експериментни дизајн



Sl. 2 – Efekti L-NAME na Td (tenzija) izometrijske kontrakcije izolovane hemidijafragme pacova tokom direktne električne subtetaničke stimulacije. Dijafragma je prethodno tretirana kumulativnim koncentracijama aminofilina (0,36, 1,08, 2,16 i 3,60 mmol/l), a zatim je mišić 30 min bio inkubiran Tyrodovim rastvorom (C-30 min) ili L-NAME u koncentracijama od 0,3, 1, 3, ili 10 mmol/l. Ordinata: Td (%). Svaki stubić predstavlja srednju vrednost $\pm$ S.E. (broj eksperimenata označen je u stubićima).
Prema Stojanoviću (40).

NO značajno potencira parametre izometrijske kontrakcije izolovane hemidijafragme pacova pri direktnoj supretaničkoj električnoj stimulaciji.

S druge strane, pod istim eksperimentalnim uslovima L-NAME je značajno potencirala efekat aminofilina na parametre izometrijske kontrakcije. Pretpostavljamo da je ovaj porast kontraktilnosti rezultat gubitka inhibitornog uticaja NO kao posledica blokade njegove sinteze.

Uloga azot-monoksida u bolestima respiratornog i mišićnog sistema

Azot monoksid ima veliki značaj u patofiziologiji i terapiji respiratornih bolesti. Dokazano je njegovo prisustvo u gornjim vazдушnim putevima gde, izgleda da povećana količina ima ulogu u regulaciji sterilnosti paranazalnih sinusa, a dokazano je prisustvo i u donjim vazдушnim putevima. Azot-monoksid se, takođe, stvara u endotelu krvnih sudova pluća, epitelu vazдушnih puteva i u različitim inflamatornim ćelijama. Kao snažan vazodilatator značajan je u održavanju plućnog vaskularnog tonusa. Danas se NO putem inhalacije primenjuje u terapiji akutnog respiratornog distress sindroma (ARDS), perzistentne plućne hipertenzije kod novorođenčadi i hroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća (42).

U terapiji akutnih stanja, kao što je ARDS, inhalaciona primena NO korisna je zbog njegove sposobnosti izazivanja

selektivne vazodilacije krvnih sudova koji snabdevaju regione pluća koji su dobro ventilirani (popravlja se odnos ventilacija/perfuzija, tj. bolja je oksigenacija), kao i sposobnosti izazivanja bronhodilatacije. Međutim, kontrolisanih, prospektivnih studija o inhalacionoj primeni NO kod ARDS za sada nema dovoljno.

Takođe, inhalaciona primena NO u maloj dozi pokazala se korisnom i u slučaju perzistentne plućne hipertenzije neonatusa, jer su kliničke studije pokazale da dovodi do povećane saturacije krvi kiseonikom i smanjuje plućni arterijski pritisak (43).

Pored terapijske primene, pokazano je da NO predstavlja važan marker alergijskih i zapaljenjskih bolesti respiratornih puteva. Kako merenje koncentracije NO u izdahnutom vazduhu predstavlja neinvazivnu metodu, verovatno će naći širu primenu u dijagnostici i praćenju osoba sa plućnim oboljenjima. Prisustvo NO u izdahnutom vazduhu ljudi i životinja prvi put je opisano 1991. godine (44). Povećana koncentracija NO u izdahnutom vazduhu javlja se kod zapaljenjskih stanja kao što su astma, virusne respiratorne infekcije i dr. Ovaj povišeni nivo smanjuje se posle antiinflamatorne terapije.

Takođe, funkcionisanje NO sistema izmenjeno je kod različitih mišićnih bolesti. Duchenneova mišićna distrofija je oboljenje koje karakteriše gubitak nNOS u nivou sarkomernih mišića i njena redistribucija u citoplazmu (45, 46).

Gubitak nNOS iz sarkoleme posledica je odsustva distrofina (cito-skeletni protein lokalizovan na sarkolemi) usled mutacije odgovarajućeg gena (47). Međutim, nNOS ne vezuje distrofin direktno već preko veze sa alfa, sintrofinom (48).

Redistribucija nNOS u citoplazmu skeletnog mišića direktno je povezana sa oštećenjima mišićnih vlakana koja karakterišu ovu distrofiju. Poznato je da NOS može da stvara i superoksidne anjone, posebno u nedostatku L-arginina, kao

i da u reakciji NO sa slobodnim kiseoničkim radikalima nastaju supstance koje mogu dovesti do oštećenja tkiva (npr. peroksinitrit). Prema tome, gubi se potencijalna uloga NO u modulaciji mišićne kontrakcije i ispoljava drugo, negativno lice ovog molekula. Moguće je da farmakološka modulacija sistema NO može biti od značaja i u terapiji neurodegenerativnih i mišićnih bolesti, mada će genska terapija ovde verovatno dati konačan odgovor.

L I T E R A T U R A

1. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994; 372(6506): 546–8.
2. Balon TW, Nadler JL. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol* 1994; 77(6): 2519–21.
3. Reid MB. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand* 1998; 162(3): 401–9.
4. Varagić VM, Kentera D. Interactions of calcium, dibutyryl cyclic AMP, isoprenaline and aminophylline on isometric contraction of the isolated hemidiaphragm of the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1978; 303(1): 47–53.
5. Varagić VM. The effects of aminophylline and adenosine on the isolated skeletal muscle. In: *Stephanovich V, Rudolphi K, Schubert P*, editors. *Adenosine: Receptors and Modulation of Cell Function*. Oxford: IRL Press; 1985. p. 307–21.
6. Prostran M, Varagić VM. The effect of 5'-N-ethylcarboxamideadenosine on the isolated hemidiaphragm of the rat during direct and indirect electrical stimulation. *Fundam Clin Pharmacol* 1989; 3(4): 371–82.
7. Prostran M, Varagić VM. The effect of forskolin on the isometric contraction of the isolated hemidiaphragm of the rat. *Br J Pharmacol* 1986; 88(4): 791–7.
8. Prostran M, Todorović Z, Varagić VM. Some new evidence on antifatigue action of aminophylline on the isolated hemidiaphragm of the rat. *Gen Pharmacol* 1993; 24(1): 225–32.
9. Todorović Z, Prostran M, Varagić VM. The effect of nickel chloride on the isolated hemidiaphragm of the rat. *Gen Pharmacol* 1995; 26(5): 1089–99.
10. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 1997; 22(12): 477–81.
11. Lee SJ, Stull JT. Calmodulin-dependent regulation of inducible and neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1998; 273(42): 27430–7.
12. Christopoulos A, El-Fakahany EE. The generation of nitric oxide by G protein-coupled receptors. *Life Sci* 1999; 64(1): 1–15.
13. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* 1992; 73(5): 1797–804.
14. Reid MB, Durham WJ. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. *Ann NY Acad Sci* 2002; 959: 108–16.
15. Fantone JC, Ward PA. Oxygen-derived radicals and their metabolites: relationship to tissue injury. 1. Current Concepts. Michigan: The Upjohn Company Kalamazoo; 1985.
16. Wu Y, Aghdasi B, Dou SJ, Zhang JZ, Liu SQ, Hamilton SL. Functional interactions between cytoplasmic domains of the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem* 1997; 272(40): 25051–61.
17. Marechal G, Gailly P. Effects of nitric-oxide on the contraction of skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(8–9): 1088–102.
18. Meszaros LG, Minarovic I, Zahradnikova A. Inhibition of the skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *FEBS Lett* 1996; 380(1–2): 49–52.
19. Stoyanovsky D, Murphy T, Anno PR, Kim YM, Salama G. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 1997; 21(1): 19–29.
20. Aghdasi B, Reid MB, Hamilton SL. Nitric oxide protects the skeletal muscle Ca²⁺ release channel from oxidation induced activation. *J Biol Chem* 1997; 272(41): 25462–7.
21. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(8): 3203–7.
22. Lohse MJ, Forstermann U, Schmidt HH. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 358(1): 111–2.
23. Lau KS, Grange RW, Chang WJ, Kamm KE, Sarelius I, Stull JT. Skeletal muscle contractions stimulate cGMP formation and attenuate vascular smooth muscle myosin phosphorylation via nitric oxide. *FEBS Lett* 1998; 431(1): 71–4.

24. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2): 109–42.
25. Feldman PL, Griffith OW, Hong H, Stuehr DJ. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG – methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *J Med Chem* 1993; 36(4): 491–6.
26. Olken NM, Marletta MA. NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry* 1993; 32(37): 9677–85.
27. Klatt P, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. *J Biol Chem* 1994; 269(3): 1674–80.
28. Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol* 1996; 118(6): 1433–40.
29. Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 1992; 281(Pt 3): 627–30.
30. Frey C, Narayanan K, McMillan K, Spack L, Gross SS, Masters BS, et al. L-Thiocitrulline. A stereospecific, heme-binding inhibitor of nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 1994; 269(42): 26083–91.
31. Bland-Ward PA, Moore PK. 7-Nitro indazole derivatives are potent inhibitors of brain, endothelium and inducible isoforms of nitric oxide synthase. *Life Sci* 1995; 57(11): PL131–5.
32. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, et al. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1993; 233(1): 119–25.
33. Todorović Z, Stojanović R, Prostran M, Vučković S, Matić I. Opposite effects of L-NAME on the isometric contraction of the rat diaphragm. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998; 358 (Suppl 2): R233.
34. Prostran M, Todorović Z, Stojanović R, Vučković S. Is Ca²⁺ necessary for the stimulatory effect of L-NAME on the rat fast skeletal muscle? *Eur J Clin Invest* 1999; 29 (Suppl 1): 72.
35. Stojanović R, Prostran M, Todorović Z, Vučković S, Matić I. The possible interaction between L-NAME and the membrane-influencing drugs. *Fund Clin Pharmacol* 1999; 13 (Suppl 1): 290.
36. Todorović Z, Prostran M, Stojanović R, Vučković S, Matić I. Aminophylline pretreatment modulates the effect of L-NAME on the isometric contraction of the isolated rat diaphragm. *Fund Clin Pharmacol* 1999; 13 (Suppl 1): 291.
37. Abraham RZ, Kobzik L, Moody MR, Reid MB, Stamler JS. Cyclic GMP is a second messenger by which nitric oxide inhibits diaphragm contraction. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1998; 119(1): 177–83.
38. Ambiel CR, Alves-Do-Prado W. Neuromuscular facilitation and blockade induced by L-arginine and nitric oxide in the rat isolated diaphragm. *Gen Pharmacol* 1997; 28(5): 789–94.
39. El Dwairi Q, Guo Y, Comtois A, Zhu E, Greenwood MT, Bredt DS, et al. Ontogenesis of nitric oxide synthases in the ventilatory muscles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18(6): 844–52.
40. Stojanović R, Todorović Z, Vučković S, Nešić Z, Prostran M. NG-nitro-L-arginine methyl ester potentiates the effect of aminophylline on the isolated rat hemidiaphragm. *J Pharmacol Sci* 2003; 92(2): 157–62.
41. Decramer M, Deschepper K, Jiang TX, Derom E. Effects of aminophylline on respiratory muscle interaction. *Am Rev Resp Dis* 1991; 144(4): 797–802.
42. Mc Fadden ER. CO, NO, and HO-1 is a Gas, Gas, Gas. Proceedings of the 96th International Conference of the American Thoracic Society; May 5–10, 2000; Toronto, Ontario, Canada. Available at URL: <http://www.medscape.com/viewprogram/451>
43. Kinsella JP, Walsh WF, Bose CL, Gerstmann DR, Labella JJ, Sardesai S, et al. Inhaled nitric oxide in premature neonates with severe hypoxaemic respiratory failure: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 354(9184): 1061–5.
44. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181(2): 852–7.
45. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 2001; 81(1): 209–37.
46. Chaubourt E, Voisin V, Fossier P, Baux G, Israel M, De La Porte S. Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin. *J Physiol Paris* 2002; 9(1–2): 43–52.
47. Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS, Masters BS, McCabe TJ, McMillan K, et al. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(17): 9142–7.
48. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda SI. Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with alpha1-syntrophin at the sarcolemma. *Microsc Res Tech* 2001; 55(3): 164–70.

Rad je primljen 21. VII 2002. god.