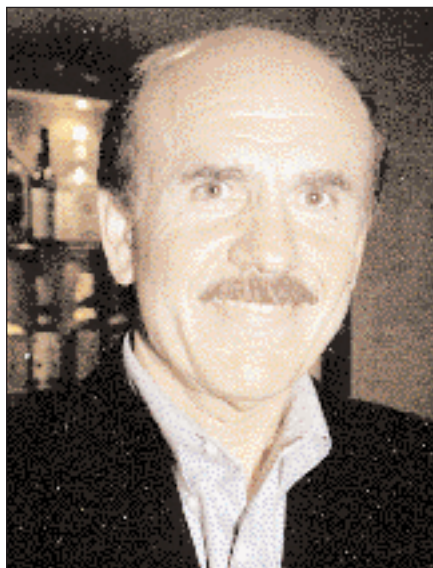




Robert F Furchgott, född 1916, verksam vid Department of Pharmacology, SUNY Health Science Center i New York.



Louis J Ignarro, född 1931, verksam vid Department of Molecular and Medical Pharmacology, UCLA School of Medicine, Los Angeles.



Ferid Murad, född 1936, verksam vid Department of Integrative Biology, Pharmacology and Physiology, University of Texas Medical School at Houston.

1998 års Nobelpris i fysiologi eller medicin

Kväveoxid som signalmolekyl i hjärt-kärlsystemet

1998 års Nobelpris i fysiologi eller medicin utdelas för upptäckten att kväveoxid är en signalmolekyl i hjärt-kärlsystemet. Det är de amerikanska forskarna Robert F Furchgott, Louis J Ignarro och Ferid Murad som belönas för de tre upptäckter som ledde till identifieringen av ett helt nytt signalsystem hos människan. Upptäckterna gällde hjärt-kärlsystemet, men kväveoxid har visat sig vara en viktig signalmolekyl även i nervsystemet och i immunsystemet, och den medverkar i regleringen av viktiga funktioner även i andra organsystem.

Kväveoxid (NO) är en färglös gas som kan bildas vid förbränning av kväve. Den omvandlas snabbt till nitriter och nitrater och har tidigare mest varit känd som en komponent i bilavgaser. Att NO skulle vara av betydelse hos människor och djur – annat än som giftig gas – var helt oväntat och innebar ett verkligt paradigmskifte. Det första ste-

get på detta forskningsområde togs när man försökte förstå hur våra kärlvidgande läkemedel fungerar.

Nitroglycerin har använts som vasodilaterare i över 100 år. Den engelske läkaren Brunton rapporterade redan 1867 goda erfarenheter av nitroglycerin vid angina pectoris. En av de många som ordinerats nitroglycerin för sin kärlkramp var Alfred Nobel, som ju själv uppfann dynamit, en blandning av nitroglycerin och kiselgur. Med sina kunskaper om nitroglycerin som sprängämne och sin erfarenhet att nitroglycerin ger huvudvärk, vägrade dock den store uppfinnaren att följa ordinationen. Han skrev i ett brev: »Det är en ödets ironi att jag av min läkare är ordinerad att äta nitroglycerin.»

I 100 år har vi använt nitroglycerin utan att förstå verkningsmekanismen. Årets Nobelpristagare har klargjort hur nitroglycerin verkar på blodkärlen – och så småningom upptäckt en helt ny mekanism för signalering i kroppen.

Cykliskt GMP – en regulator av glattmuskelfunktion

Ferid Murad, farmakolog och internmedicinare, studerade i mitten av 1970-

talet ämnet cykliskt guanosinmonofosfat (cGMP), en second messenger-molekyl som bildas i många celler och som visade sig kunna relaxera glattmuskelceller. Murads lärare Earl Sutherland hade upptäckt cykliskt adenosinmonofosfat (cAMP), vilket ledde till Nobelpris 1971. I kölvattnet på denna upptäckt var många laboratorier världen över sysselsatta med att mäta cAMP- och cGMP-nivåer i olika celler. Det var emellertid svårt att få en klar bild över cGMPs roll i cellen, eftersom en mängd olika ämnen tycktes påverka cGMP.

Ferid Murad bestämde sig för att iso-

Författare

GÖRAN K HANSSON
professor i kardiovaskulär forskning

HANS JÖRNVALL
professor i medicinsk kemi

STEN G E LINDAHL
professor i anesthesiologi, vice ordförande i Nobelkommittén; samtliga vid Karolinska institutet och ledamöter av Nobelförsamlingen, Stockholm.

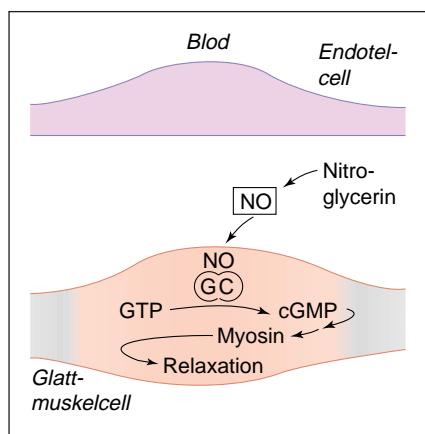
lera det cGMP-bildande enzymet, guanylylcyklas, och i rena enzympreparationer undersöka hur dess aktivitet reglerades. Han fann bl a att glatta muskelceller innehåller relativt stora mängder guanylylcyklas och att cGMP-halten verkade vara kopplad till muskelfunktionen. Guanylylcyklaspreparationer från olika organ uppvisade dock helt olika egenskaper, och Murad misstänkte att föroreningar störde analyserna. Därför tillsatte han natriumazid, NaN_3 , för att förhindra degradation av enzym eller substrat. Han fann då till sin förvåning att enzymet aktiverats [1]. Azidbehandling ledde dock inte till någon momentan aktivering av guanylylcyklas, utan skedde efter en viss fördröjning. Bildades en intermediär som i sin tur aktiverade enzymet?

När man testade natriumazideffekten på olika vävnader, bildades cGMP bara i vissa av dem. Det tycktes finnas makromolekyler som förhindrade reaktionen och andra som förstärkte den. Murad och hans medarbetare renade faktorerna, som visade sig vara kända proteiner. Enzymet katalas var nödvändigt för att natriumazid skulle aktivera guanylylcyklas, medan hemoglobin blockerade reaktionen. En del lågmolekylära substanser påverkade också cGMP-bildningen, och bl a kunde natriumnitrit ersätta natriumazid som aktiator.

Var dessa kemiska reaktioner kopplade till muskelarbetet? Var cGMP en regulator av glattmuskeltonus? Det var nu dags att gå över till funktionella studier av glatt muskulatur. Murad hade tidigare konstruerat en preparation av bovin trakea där man kunde mäta glattmuskelcellers kontraktilitet, och man testade effekten av natriumazid och natriumnitrit på kontraktion och cGMP-bildning. Man hade väntat sig att cGMP skulle mediera kontraktion, men det visade sig att tillsats av natriumazid och nitrit inducerade cGMP-bildning, vilket ledde till relaxation istället för kontraktion [2]. Kunde detta vara en generell mekanism för att relaxera glatt muskel? Man gick nu över till kärldilaterande farmaka, som ju verkar genom att sänka glattmuskeltonus i artärer.

Nitroglycerin verkar genom att frisätta NO

Nitroglycerin och natriumnitrosid tillsattes till glattmuskelpreparationer och visade sig öka cGMP-halten och relaxera muskelcellerna [3]. Intressant nog krävdes inte tillsats av katalas för att nitroglycerin skulle relaxera glatt muskulatur. Nitroglycerin kunde uppenbarligen ensamt generera en intermediär som natriumazid förmådde skapa i närvaro av katalas. Hemoglobin blockerade emellertid både nitroglyce-



Figur 1. Kväveoxidens (NO) verkningsmekanism i glattmuskelcellen. Murad upptäckte att nitroglycerin orsakar kärldilatation genom att frisätta NO, som diffunderar in i glattmuskelcellen och aktiverar guanylylcyklas (GC). En kaskadreaktion som leder till relaxation av de kontraktila aktin-myosinfilamenten startar. GTP = guanositrifosfat. cGMP = cykliskt guanosinmonofosfat.

rinets och natriumazidens effekter.

Katalas konverterar väteperoxid till vatten och syre, och hemoglobin binder syre. Kunde natriumazidens kväve reagera med syre och bilda en NO-förening? Murad ställde upp hypotesen att den okända intermediären var NO och att nitroglycerin verkar genom att frisätta NO i kärlväggen. Han testade hypotesen genom att bubbla NO-gas förbi en guanylylcyklaspreparation och fann att enzymet då aktiverades. Guanositrifosfat (GTP) omvandlades till cGMP, och kinetiken talade för att NO-molekyler band till bindningsställen på guanylylcyklasproteinet. En ny princip för reglering av enzymaktivitet hade upptäckts, och gåtan om nitroglycerinets verkningsmekanism var löst (Figur 1).

Originalarbetet kom ut i Proceedings of the National Academy of Sciences 1977 [4]. Redan här visade Muradgruppen att NO aktiverar guanylylcyklas i en rad olika vävnader, bl a hjärta, trakea och hjärna. Detta pekade på en generell mekanism som går utöver nitroglycerinets blodkärlseffekt. Detta ledde tankarna till att farmaka kanske utnyttjade en endogen signaleringsväg. 1978 föreslog Murad att hormoner och andra kroppsegna substanser skulle kunna verka genom att frisätta NO från endogena prekursorer. Det skulle emellertid dröja åtta år innan man fick bevis för att så var fallet.

Hur verkar då NO på guanylylcyklas? Det var känt att NO binder till hemgrupper, t ex i hemoglobin, och Murad spekulerade över att guanylylcyklas skulle kunna ha en hemgrupp. Gerzer och medarbetare [5] visade 1981 att så verkligen var fallet, och Ignarro lade 1984 fram hypotesen att NO genom att binda till hemgruppen orsakar en kon-

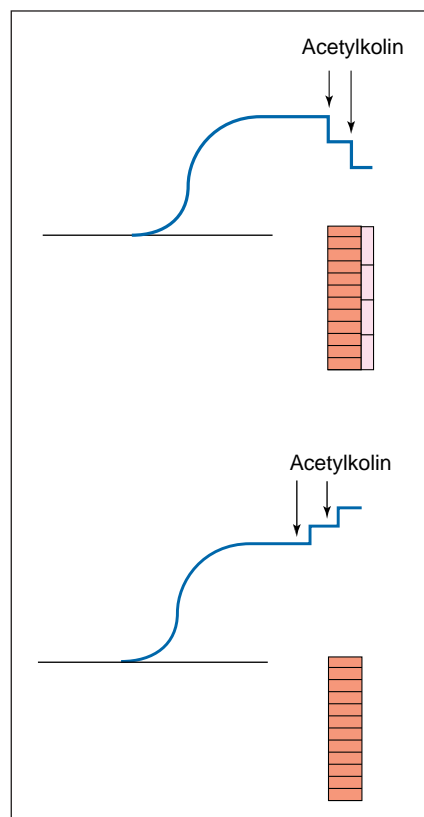
formationsförändring i enzymet [6]. Detta leder till aktivering, och GTP konverteras till cGMP (Figur 1). Denna hypotes har kunnat bekräftas i senare undersökningar. Verkningsmekanismen för nitrovasodilaterare är följande:

Nitroglycerin och de andra nitropreparaten frisätter NO i kärlväggen. NO är en gasformig molekyl som penetrerar cellmembranet in i glattmuskelcellen, där den binder till hemgruppen i guanylylcyklas. Enzymets konformation förändras, dess aktiva centrum öppnas, och GTP kan omvandlas till cGMP. Denna startar en kaskadreaktion – cGMP aktiverar ett cGMP-beroende proteinkinase, flera andra steg kopplas in, och slutsultatet är att en fosfatgrupp klipps av från myosinproteinets lätta kedja (Figur 1). Detta leder till relaxation av de kontraktila filamenten: muskelcellen slappas av och kärntonus sjunker [7, 8].

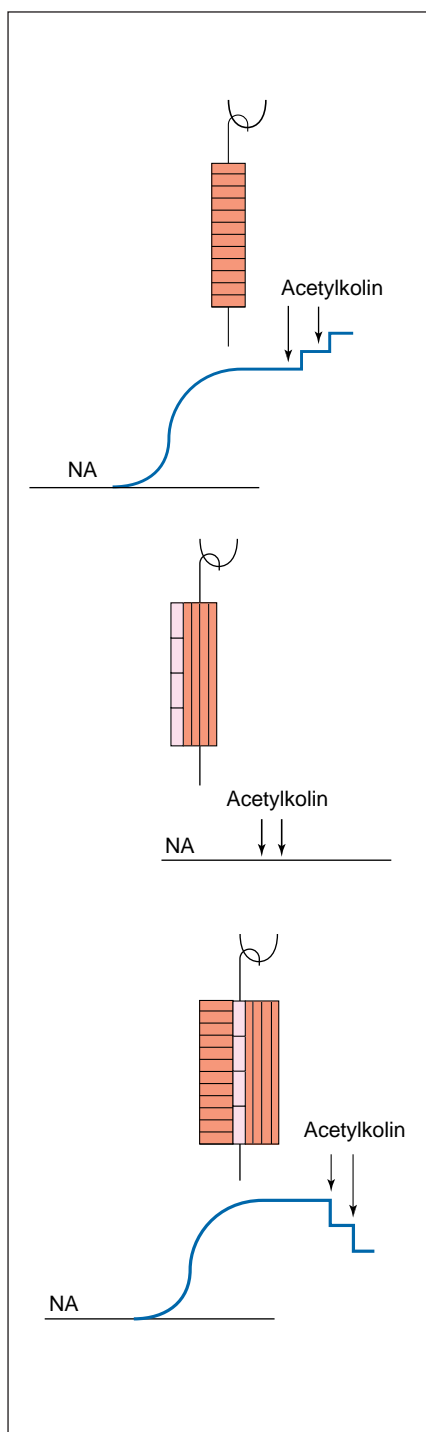
EDRF, Furchgotts mystiska kärrelaxerande endotelfaktor

Murads studier var fokuserade på farmakologiska fenomen, och några be-

Figur 2. Endotelberoende kärrelaxation i organbadsförsök. Bilden illustrerar två schematiska tryckregistreringar från organbadsförsök där kärlväggens glatta muskulatur prekontraherats av exempelvis noradrenalin. Det övre diagrammet visar acetylkolineffekterna då endotelet bevarats (streckad rektangel täckt av endotel). Det nedre diagrammet redovisar effekterna av acetylkolin då endotelet saknas, illustrerat av den streckade stående rektangeln.



Figur 3. Schematisk presentation av Furchgotts och Zawadskis sandwich-försök för att påvisa endotelfaktorn EDRF [9]. Tre tryckregistreringar illustreras. Överst visas prekontraktion av kärlvägg utan endotel, efter noradrenaltillsats (NA). Effekterna av acetylkolin verifieras dem som återgivits nedtill i Figur 2. Preparatet, från kaninaorta, är transversellt utskuret. I mitten har en longitudinellt utskuren artärbit monterats. Denna har bibehållet endotel. De longitudinellt skurna muskelfibrerna ger inget mätbart svar på vare sig NA eller acetylkolin. Nedtill ses de båda artärbitarna monterade tillsammans i en sandwich. Efter prekontraktion med NA ger nu acetylkolintillsats en relaxation av den transversellt utskurna artärbiten. En faktor måste ha diffunderat från endotelpreparatet till det endotellösa preparatet och inducerat en relaxation av muskelcellerna.



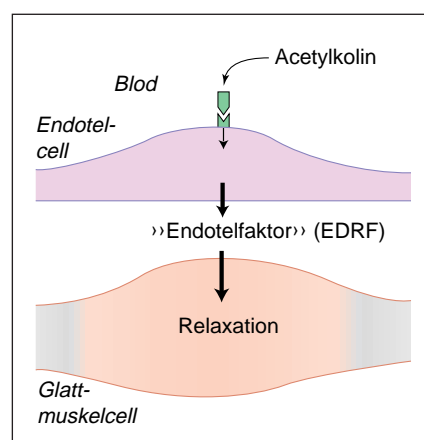
vis för att NO spelar en fysiologisk roll fanns inte i slutet av 1970-talet. Frågan om NO kunde frisättas även vid »endogen» signalering var fortfarande helt öppen. Det blev Robert F Furchgott, farmakolog vid SUNY, State University of New York, som kom att ta nästa steg i kunskapsutvecklingen.

Furchgott bedrev cirkulationsfysiologisk forskning och hade bl a utvecklat metodik för att mäta artärtonus in vitro. Ringar eller spiraler skars ut från kaninaorta och hängdes upp i organbad där kontraktioner kunde mätas. En rad olika substansers effekter på artärkontraktion studerades. De flesta av dem påverkade artärringarna på det sätt man förväntat från in vivo-studier, men acetylkolin uppträdde paradoxalt. Trots att substansen är en vasodilaterare in vivo, inducerade acetylkolin en kontraktion av artärringen i organbadet. Fenomenet var reproducibelt och acetylkolin kom till och med att användas för att konträngera artärpreparationerna efter dilatation med adrenerga blockerare.

Men en ny laboratorieassistent fick inte systemet att fungera. 1978 erhöLL han istället en relaxation av artärringen vid behandling med acetylkolin. Furchgott började leta efter orsaken till de motstridiga resultaten. Han gjorde morfologiska undersökningar av artärringarna och fann att man i de flesta preparationer hade skadat endotellagret. Sådana skadade artärpreparationer svarade på acetylkolin med kontraktion. Men i artärringar där man noggrant undvikit att röra endotelet utlöste acetylkolin istället en relaxation (Figur 2). Fanns det alltså en endotelberoende kärlrelaxation?

Furchgott tog nu dessa observationer ytterligare ett steg. I en genialiskt enkel försöksupställning, som beskrivs schematiskt i Figur 3, lade han ihop två artärbitar i en s k sandwich. Den ena artärbiten hade skurits longitudinellt över muskelfibrerna så att deras tonus inte kunde registreras. Den andra halvan av sandwichen var skuren transversellt så att tonus i artärväggens muskelfibrer kunde uppmätas i organbadsförsök. I denna artärbit hade man emellertid skrapat av endotelet med hjälp av ett filterpapper. Sedan tillsattes noradrenalin för kontraktion och därefter acetylkolin för relaxation, antingen till vardera artärbiten för sig eller till sandwichen.

Den longitudinellt skurna artärbiten påverkades förstås inte på något mätbart sätt av någondera av substanserna. Den transversella artärbiten prekontraherades av noradrenalin, men när acetylkolin tillsattes erhöLLs ingen relaxation. Istället erhöLLs en måttligt förstärkt kontraktion eller också uteblev effekten helt (Figur 3). Om acetylkolin däremot



Figur 4. Den endotelberoende relaxerande faktorn, EDRF. Furchgott visade att acetylkolin stimulerar endotelceller till att frisätta en faktor, EDRF, som relaxerar kärlväggens glattmuskelceller.

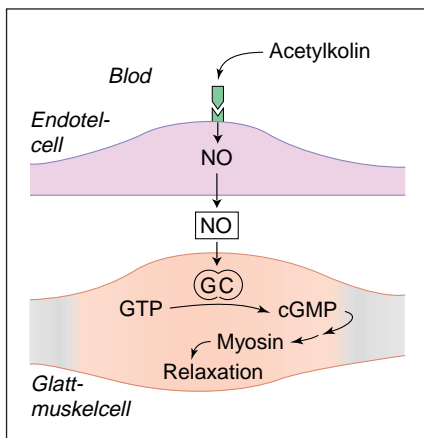
sattes till sandwichen, relaxerades den transversellt skurna artärbiten, som nu var i kontakt med endotelet i den longitudinellt skurna vävnaden (Figur 3). Furchgott drog slutsatsen att endotelet bildade en faktor som påverkade muskelcellerna så att dessa relaxerades (Figur 4).

Faktorn, som några år senare kom att benämnas EDRF, »endothelium-derived relaxing factor», beskrevs av Furchgott i en artikel i Nature 1980 [9]. Det rörde sig om en mycket labil substans som inte tycktes vara identisk med vare sig bradykinin, prostacyclin, cAMP, cGMP eller adenosin. Furchgott framlade redan nu hypotesen att den relaxation som orsakades av faktorn skulle kunna åstadkommas genom aktivering av guanylylcyklas [10]. Han spekulerade i samma publikation över att faktorn möjligen kunde vara den fria radikalen NO, som ju Murad redan 1977 identifierat som aktivator av enzymet.

Nu startade en veritabel jakt på EDRFs identitet. Men dess exakta kemiska natur skulle förbli en gåta i flera år. En viktig ledtråd erhöLLs när flera grupper, bl a Murads, visade att EDRF i likhet med NO aktiverar guanylylcyklas [11]. Furchgott och medarbetare fann att denna reaktion blockerades av hemoglobin och metylenblått, två kända NO-inaktiverare [12]. Flera observationer pekade alltså på likheter mellan EDRF och NO, och i januari 1986 sände Murad in en artikel till Journal of Clinical Investigation där han föreslog att »These studies suggest that EDRF could be viewed as the endogenous equivalent of the nitrovasodilators or the 'endogenous nitrate'» [7].

EDRF = NO!

Louis J Ignarro, farmakolog vid University of California i Los Angeles



Figur 5. EDRF är detsamma som kväveoxid (NO). Furchgott och Ignarro visade – oberoende av varandra – att EDRF utgörs av NO. Denna frisätts av endotelet bl a vid acetylkolinstimulering, diffunderar in i glattmuskelcellen, inducerar syntes av cyklistiskt guanosinmonofosfat (cGMP) genom påverkan på guanylylcyklas (GC) och relaxerar cellen. GTP = guanosintrifosfat.

(UCLA), hade sedan slutet av 1970-talet intresserat sig för reglering av kärltonus. Han hade på grundval av Murads pionjärarbete studerat kväveoxidens effekter på guanylylcyklas och bland annat karakteriserat dess effekter på artärmuskelceller. Han gav sig in i jakten på EDRFs kemiska natur med sina kunskaper om kväveoxid och glatt muskulatur i bagaget. Tillsammans med sina medarbetare undersökte Ignarro hur lungartären svarar på EDRF och kväveoxid. Han fann att både den endotelberoende relaxationen och den NO-utlösna blockerats av hemoglobin, metylenblått och kolmonoxid. Dessutom bekräftade han att både EDRF- och NO-stimulering leder till cGMP-ökning (Tabell I).

Liknande fynd gjordes samtidigt av Furchgott. Ignarro gick emellertid ett steg längre och lyckades kemiskt identifiera EDRF som NO. Detta skedde med en spektrofotometrisk metod. Det var känt att NO – liksom kolmonoxid – förändrar hemoglobinet spektrum när det binder till hemgruppen. Ignarro visade nu att EDRF också gav en förändring av hemoglobinet absorptions och att denna var identisk med den förändring som NO orsakar. EDRF var alltså NO, och hela signalkedjan var nu identifierad på molekylär nivå (Figur 5).

Både Ignarro och Furchgott rapporterade sina fynd vid en konferens på Mayo-kliniken i Rochester, Minnesota, i juli 1986. De drog båda slutsatsen att EDRF är NO och presenterade denna konklusion även vid flera andra konferenser under 1986–1987 [13–16]. Ignarros fynd publicerades i två fullständiga originalartiklar 1987 [17, 18], medan Furchgotts endast kom att redovisas i

den bok som utgavs efter Mayo-mötet [19].

Observationen att EDRF var identisk med kväveoxid bekräftades snabbt av Salvador Moncada och medarbetare [20] och därefter av flera andra laboratorier. Gåtan om »det kroppsegna nitroglycerinet» var löst – artärernas egna endotelceller bildar kväveoxid, en gas som går rakt in i artärmuskelcellerna och stänger av deras kontraktion och på så vis ger upphov till en blodkärlsvidgning.

NO-lavinen börjar sätta sig i rörelse

Med upptäckten att kväveoxid är en signalmolekyl startade en fullkomlig lavin. NO visade sig vara inblandad inte bara i blodkärlens utan även i nervsystemets signalering. När gasen bildas i en nervcell, sprids den åt alla håll och aktiverar celler i omgivningen. Detta tycks vara betydelsefullt för så skilda funktioner som kontrollen av beteendet, tömningen av magsäcken och erektionen i penis.

En viktig uppgift för kväveoxid påträffades inom immunsystemet. När makrofager aktiveras börjar de bilda stora mängder NO. Eftersom NO är en radikal, dvs har en oparad elektron i sitt yttersta elektronskal, är molekylen mycket reaktiv. Vid höga NO-koncentrationer binds inte allt NO upp av hemgrupper i proteiner som guanylylcyklas och myoglobin, utan NO kan attackera och skada andra makromolekyler, bland dem DNA och andningskedjans

proteiner. Makrofagen utnyttjar detta fenomen för att destruera fagocyterade mikroorganismer, och NO fyller därigenom en viktig uppgift i infektionsförsvaret.

Efter prisupptäckterna: Tre olika NO-syntaser identifieras

NO-bildningen i den aktiverade makrofagen krävde närvaro av aminosyran arginin [21, 22]. Även endotelcellernas NO-bildning visade sig utgå från arginin [23]. Moncada föreslog att ett enzym, NO-syntas (NOS), konverterar arginin till NO under samtidig bildning av citrullin [23, 24]. Den kemiska reaktionen är följande:



NO-syntas kunde isoleras från endotelet av Murad och medarbetare, och cDNA för tre olika isoformer av NO-syntas klonades av olika forskare i början av 1990-talet [25–29], se Tabell II.

NO-syntas förekommer i hjärnan (NOS1 eller neuronalt NOS, nNOS) och i kärlendotelet (NOS3 eller endotelialt NOS, eNOS). Dessutom kan proinflammatoriska cytokiner som interleukin-1, TNF och interferon- γ inducera bildning av ett NO-syntas (NOS2 eller inducibelt NOS, iNOS) i makrofager och en rad andra celler. Både nNOS och eNOS regleras av Ca^{2+} , och nervcellens respektive endotelcellens kalciumkoncentration styr bildningen av NO. Substanter som acetylcolin verkar genom att öka den intracellulära kalciumkoncentrationen och därigenom aktivera

Tabell I. Bevis som Furchgott och Ignarro framlade 1986 för att EDRF är detsamma som kväveoxid (NO)

Mätmetod	Effekt	Referens
cGMP-analys i glattmuskulatur	EDRF och NO ökar cGMP	Furchgott, Ignarro
Kärlrelaxation	EDRF och NO blockerats av Hb	Furchgott, Ignarro
Kärlrelaxation	Syreradikaler hämmar EDRF och NO	Furchgott
Kärlrelaxation	UV-ljus frisätter NO från nitrit och imiterar EDRF	Furchgott
Kärlrelaxation	CO blockerar Hb-effekten på EDRF–binder NO	Ignarro
Kärlrelaxation	EDRF och NO blockerats av metylenblått	Furchgott, Ignarro
Spektrofotometri	NO och EDRF förändrar Hb-spektrum på identiskt sätt	Ignarro

Tabell II. Konstitutiva NO-syntaser bildas ständigt i cellen men kräver aktivering via kalciumjoner. Det inducibla syntaset bildas bara när cellen stimulerats av cytokiner att transkribera NOS2-genen.

Isoform	Förekomst	Reglering	Aktivatörer
nNOS (NOS1)	Neuron	Konstitutiv	Intracellulärt Ca^{2+}
iNOS (NOS2)	Makrofager, kärlceller m fl	Inducibel	Cytokiner, endotoxiner
eNOS (NOS3)	Endotel	Konstitutiv	Intracellulärt Ca^{2+}

NOS. På så vis kan en finjustering av NO-bildning åstadkommas.

Kväveoxid som neurotransmittor

Både det centrala och det perifera nervsystemet innehåller NO-bildande neuron. I CNS hade man med histochemisk metodik identifierat neuron som färgas av den så kallade diaforasreaktionen. Det var dock oklart vilka de naturliga substraten och produkterna vid diaforasreaktionen var, tills Solomon Snyder och medarbetare fann att diaforas var identiskt med NO-syntas. Den neuronala NO-bildningen är inkopplad i neurotransmissionen, och NO tycks fungera som en oortodox transmittor. Till skillnad från alla andra neurotransmittorer kan NO penetrera membran, och därför behövs inga celltyperceptorer för NO. Istället verkar NO direkt på cGMP-syntesen i de neuron som omger det nNOS-innehållande neuronet. Den fysiologiska betydelsen av NO-transmission är ännu inte helt klarlagd, men beteendet kan vara en måltavla. Knockout-möss som saknar fungerande nNOS-gen är nämligen extremt aggressiva.

Man kände till att vissa autonoma nerver i det perifera nervsystemet varken var adrenerga eller kolinerga. Dessa så kallade NANC(non-adrenergic non-cholinergic)-nerver visade sig innehålla NOS [30]. De är betydelsefulla bl a för pylorusrelaxation vid ventrikeltömning och för erektion.

Kväveoxidens roll i infektionsförsvaret

Den cytokinberoende NO-bildningen följer en helt annan kinetik än den konstitutiva NO-bildningen i nervceller och endotel. Det cytokininducibla enzymet är kalciumberoende och bildar kontinuerligt mycket stora mängder NO från arginin. Avgörande för NO-bildningen är därför om iNOS förekommer i cellen eller inte. Cytokinernas förmåga att aktivera iNOS-genen styr alltså NO-bildningen. Bakteriella endotoxiner kan aktivera iNOS-genen på samma sätt som cytokiner, och detta är förmodligen del i ett fylogenetiskt mycket gammalt försvar mot gramnegativa infektioner. NO-bildning som svar på endotoxiner påträffas till och med hos hästskokrabban, ett slags levande fossil som för över 500 miljoner år sedan avvek från den utvecklingslinje som kom att leda till människan.

Möss som saknar förmåga att bilda NO via den cytokininducibla vägen kan inte försvara sig mot intracellulära bakterier som *Listeria monocytogenes*, och NO-bildning tycks vara en central komponent i det immunologiska »ospecifika» försvaret mot mikroorganismer och parasiter. Hos människa kan dock för-

mågan att bilda stora mängder NO som svar på endotoxiner skapa problem. Septisk chock kan bero på att gramnegativa bakterier frisätter stora mängder endotoxiner, som aktiverar iNOS-vägen. Enorma mängder NO bildas, resistanskärlen dilateras och cirkulatorisk chock inträder.

Kväveoxid i kliniken

Intresset har varit stort för att utnyttja de nyvunna kunskaperna om NO i klinisk medicin. Inom kardiovaskulär medicin är de kärldilaterande nitropreparaten förstuds mycket användbara – men de är ju en orsak till snarare än en följd av upptäckten av signalmolekylen NO! En förhoppning har varit att kunna åstadkomma en långvarig *vasodilatation* och tillväxthämning genom kontinuerlig NO-sekretion. Detta skulle vara värdefullt t ex för att bevara kransartärer öppna efter ballongvidgning (PTCA). Kloningen av NO-syntaser har öppnat möjligheten att åstadkomma en bestående NO-produktion med gentterapi, och flera laboratorier arbetar med att försöka introducera NO-syntas i kärlväggen i samband med kärlkirurgiska och kardiella ingrepp.

I kroppen omvandlas NO snabbt till nitrit och nitrat, och det har därför varit svårt att mäta endotelets NO-bildning. Genom att kombinera fysiologiska undersökningar av endotelberoende kärlrelaxation, bestämning av NO bundet till hemoglobin i blod och utsöndrade nitroföreningar i urin har man emellertid fått en god bild av hjärt-kärlsystemets NO-bildning vid hälsa och sjukdom [31].

I början av NO-eran trodde man att NO bildades bara i kortvariga pulsar i samband med att endotelet stimulerades med acetylkolin, bradykinin och liknande signalsubstanser. Det har emellertid visat sig att kärlbädden står under en kontinuerlig, NO-beroende relaxation. Tillförs NO-syntashämmande argininanaloger stiger alltså blodtrycket. Med denna kunskap som grundval pågår arbete på många håll för att få fram nya blodtrycks- och genomblödningssreglerande farmaka.

Vid *ateroskleros* är endotelets NO-produktion nedsatt [32]. Istället förekommer en cytokinberoende NO-bildning i både makrofager och glattmuskelceller [33, 34]. Betydande mängder NO kan förmodligen frisättas på detta sätt, och aterosklerosjukdomen kännetecknas snarare av en störd reglering än av en egentlig brist på NO.

NO har ägnats stort intresse inom intensivvården alltsedan NO-produktion kunde knytas till utveckling av *septisk chock*. Bl a har man försökt behandla chock och ARDS (adult respiratory dis-

tress syndrome) med NO-gas. Resultaten av de kliniska prövningarna har emellertid varit motstridiga, och det är ännu för tidigt att säga om NO-behandling kommer att vara viktig inom detta område.

Pulmonell hypertension är ett allvarligt kliniskt problem hos nyfödda barn med lungventilationsstörningar. Här har kväveoxid varit livräddande, och sådana störningar kan bli en viktig indikation för NO-behandling [35].

Den kraftiga NO-bildningen vid cytokinaktivering av celler kan utnyttjas i diagnostiken av *inflammatoriska sjukdomar* [36]. Moderna NO-detektorer kan registrera förhöjda halter av den instabila gasen, vilket ger nya diagnostiska möjligheter. Astma kan diagnostiseras genom mätning av NO i utandningsluft, och inflammatoriska tarmsjukdomar genom mätning av NO-halten i flatus.

Tumörceller kan drivas i apoptos (programmerad celledöd) genom NO-bildning. Det rör sig då om stora mängder NO, som bildas via den cytokininducibla vägen [37]. Både blodkärleceller och makrofager skulle kunna svara för en sådan NO-beroende tumörcytotoxicitet, och det är möjligt att detta skulle kunna utnyttjas i framtida cancerterapi.

Impotensproblem är ett uppmärksammat område för NO-baserad behandling. NO spelar en viktig roll vid erektionen genom att dilatera svällkropparna i penis. Viagra är ett nytt läkemedel som hämmar nedbrytningen av cGMP och därigenom potentierar effekten av NO på svällkropparna. Viagrabehandling är effektiv vid impotens, men om patienten samtidigt tar nitropreparat på grund av hjärtproblem kan farliga interaktioner uppstå. Detta har nyligen uppmärksammats, bl a av det svenska läkemedelsverket.

Reflexioner om årets Nobelpris i fysiologi eller medicin

Forskningen kring NO har haft en ovanlig utveckling. Under de senaste decennierna har många framgångsrika utvecklingslinjer inom medicinen sprungit ur forskningsrön inom den biomedicinska basalvetenskapen. Årets Nobelpris illustrerar det omvända. En klinisk observation och behandlingstradition utgör källan till ny kunskap inte bara inom den kliniska medicinen utan också inom den basala biologiska vetenskapen. Detta exemplifierar den stora betydelsen av en nära relation mellan basal och kliniskt orienterad medicinsk vetenskap. I och med upptäckten av den endogena NO-bildningen upptäcktes också ett slags *kroppseget nitroglycerin* som dessutom visade sig vara en helt ny signalmolekyl i organismen. Det är tro-

ligt att dessa upptäckter kommer att leda till många nya landvinningar inom basalvetenskapen och till att flera nya och bättre behandlingsmöjligheter för våra patienter kommer att utvecklas. Vi har förmodligen bara sett början på den nya NO-eran inom medicinen.

Referenser

- Kimura H, Mittal CK, Murad F. Increases in cyclic GMP levels in brain and liver with sodium azide, an activator of guanylate cyclase. *Nature* 1975; 257: 700-2.
- Katsuki S, Murad F. Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Molecular Pharmacology* 1977; 13: 330.
- Katsuki S, Arnold PW, Murad F. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *Journal of Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* 1977; 3: 239-47.
- 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 U S A* 1977; 74: 3203-7.
- Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, Schultz C. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett* 1981; 132: 71-4.
- Ignarro LJ, Wood K, Wolin M. Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* 1984; 17: 267-74.
- Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986; 78: 1-5.
- Murad F. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA* 1996; 276: 1189-92.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
- Furchgott RF, Zawadzki JV, Cherry PD. Role of endothelium in the vasodilator response to acetylcholine. In: Vanhoutte PM, Leusen I, eds. *Vasodilation*. New York: Raven Press, 1981: 44-6.
- Rapoport RM, Murad F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ Res* 1983; 52: 352-7.
- Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 708-16.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Pharmacological and biochemical properties of endothelium-derived relaxant factor (EDRF): Evidence that EDRF is closely related to nitric oxide (NO) radical. *Circulation* 1986; 74: II-287.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) released from artery and vein appears to be nitric oxide (NO) or a closely related radical species. *Federation Proceedings* 1987; 46: 644.
- Furchgott RF, Khan MT, Jothianandan D. Comparison of endothelium-dependent relaxation and nitric oxide-induced relaxation in rabbit aorta. *Federation Proceedings* 1987; 46: 385.
- Khan MT, Furchgott RF. Similarities of behavior of nitric oxide (NO) and endothelium-derived relaxing factor in a perfusion cascade bioassay system. *Federation Proceedings* 1987; 46: 385.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 9265-9.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987; 61: 866-79.
- Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM, ed. *Vasodilation*. New York: Raven Press, 1988: 401-14.
- Palmer R, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
- Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deaminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235: 473-6.
- Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27: 8706-11.
- Palmer R, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-6.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2009-12.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-8.
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225-8.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6348-52.
- Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M et al. Purification and characterization of EDRF particulate synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10480-4.
- Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992; 90: 2092-6.
- Andersson KE, Garcia-Pascual A, Forman A, Töttrup A. Non-adrenergic non-cholinergic nerve-mediated relaxation of rabbit urethra is caused by nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 1991; 141: 133-4.
- Wennmalm Å, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler JN, Lundin S et al. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. *Circ Res* 1993; 73: 1121-7.
- Zeiger AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84: 1984-92.
- Hansson GK, Geng YJ, Holm J, Hårdhammar P, Wennmalm Å, Jennische E. Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. *J Exp Med* 1994; 180: 733-8.
- Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996; 75: 77-85.
- Schedin U, Norman M, Gustafsson LE, Jonsson B, Frostell C. Endogenous nitric oxide in the upper airways of premature and term infants. *Acta Paediatr* 1997; 86: 1229-35.
- Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6: 1368-70.
- Geng YJ, Hellstrand K, Wennmalm Å, Hansson GK. Apoptotic death of human leukemic cells induced by vascular cells expressing nitric oxide synthase in response to interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Cancer Res* 1996; 56: 866-74.